

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 387**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2012** **PCT/IB2012/052545**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012** **WO12156958**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2012** **E 12727943 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** **EP 2710123**

54 Título: **Estirpe celular de linfocitos que comprende células γ - δ , composición y método de producción de la misma**

30 Prioridad:

19.05.2011 PT 2011105714

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.11.2017

73 Titular/es:

**INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR (100.0%)
Av. Prof. Egas Moniz Edificio Egas Moniz
1649-028 Lisboa, PT**

72 Inventor/es:

**DE CARVALHO E SILVA SANTOS, BRUNO
MIGUEL y
VARGAS CORREIA, DANIEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 643 387 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estirpe celular de linfocitos que comprende células $\gamma\delta$, composición y método de producción de la misma

Campo técnico de la invención

5 La invención se refiere a una estirpe celular de linfocitos que comprende células T $\gamma\delta$, composición y método de producción de las mismas, y uso médico a saber para el uso en medicina, a saber en inmunoterapia contra el cáncer.

Antecedentes

10 Los tumores se desarrollan en anfitriones dotados de un sistema inmunitario altamente complejo que incluye diversos subgrupos de linfocitos capaces de reconocer y destruir las células transformadas. Ahora es ampliamente aceptado que, mientras que los linfocitos pueden patrullar constantemente la formación del tumor, las células cancerígenas desarrollan estrategias moleculares para evadir la vigilancia inmunitaria, que son competitivos seleccionado bajo la presión del sistema inmunitario del anfitrión. Se considera que este proceso dinámico, denominado "inmunoedición de cáncer", constituye un obstáculo importante para la inmunoterapia del cáncer.

15 Entre múltiples mecanismos de evasión inmunitaria, se ha demostrado recientemente que las muestras de leucemia y linfoma primario a menudo regulan a la baja la proteína MHC (complejo de histocompatibilidad mayor) no clásica, ULBP1, que es crítica para el reconocimiento de tumores hematológicos por las células T $\gamma\delta$ que expresan el NKG2D contrarreceptor (Lanca, T. et al., "The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity", Blood 115:2407-2411; 2010).

20 Las células T $\gamma\delta$ son linfocitos tipo innato que dan cuenta de 1 a 10% de los linfocitos de sangre periférica (PBL) de individuos sanos y que son capaces de dirigirse a una fracción significativa de estirpes celulares tumorales hematológicas probadas en el laboratorio. Sin embargo, se demostró que muchas muestras de leucemia linfóide primaria son resistentes a V γ 9V δ 2 células T activadas completamente (Lanca, T. et al., "The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity", Blood 115:2407-2411, 2010; Gomes, A.Q. et al., "Identificación de un panel de ten cell surface protein antigens associated con immunotargeting of leukemias and lymphomas by peripheral blood gammadelta T cells", Haematologica 95:1397-1404, 2010), el subgrupo dominante de los $\gamma\delta$ PBL. Adicionalmente, los ensayos clínicos que implican la administración in vivo de activadores de células T V γ 9V δ 2 han demostrado un éxito limitado, con respuestas objetivas limitadas a 10-33% de los pacientes, ya sea con tumores hematológicos o sólidos. Aún más modesto ha sido el resultado de los ensayos que implican la transferencia adoptiva de células V δ 2⁺ activadas/ampliadas, ya que no se han reportado respuestas objetivas. De hecho, la simple expansión ex vivo de células T autólogas V δ 2⁺, a cuya vigilancia el tumor logró escapar in vivo, se puede condenar a poco efecto terapéutico luego de la re-inyección en el paciente.

35 La inmunoterapia del cáncer se basa en el reconocimiento de células tumorales por los linfocitos citotóxicos. Las células T $\gamma\delta$ son una población de linfocitos citotóxicos no restringidos a MHC que cumplen funciones críticas en diversos modelos de tumores de animales. A pesar de ello, se mostró que una gran proporción de tumores hematológicos humanos es resistente a linfocitos $\gamma\delta$ de sangre periférica (PBL) activados con agonistas específicos para el receptor de células T V γ 9V δ 2 altamente prevalente (TCR). Esto probablemente constituye una limitación importante a la inmunoterapia actual mediada por células T $\gamma\delta$.

40 Por lo tanto, es crítico invertir en estrategias que dotan a las células T $\gamma\delta$ con maquinaria de reconocimiento adicional para detectar tumores que han resistido los componentes naturales presentes in vivo.

Se identificaron los receptores de citotoxicidad natural por A. Moretta y compañeros de trabajo hace más de una década, y se demostró que desempeñan papeles críticos sinérgicos en las funciones anti-tumorales de las células citotóxicas naturales (NK). De hecho, los NKp30 y NKp46 son ampliamente considerados como dos de los marcadores más específicos de células NK.

45 El documento escrito por von Lilienfeld-Toal, M., J. Nattermann, et al. (2006). "Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells." Clin Exp Immunol 144(3): 528-533. divulga la expresión de un receptor NK en linfocitos T $\gamma\delta$ de sangre periférica. Sin embargo, se divulgan células T $\gamma\delta$ diferentes de aquellas indicadas en la presente invención. El documento también revela, por el contrario a la presente invención, que el NKp30 no se expresa en dichas células T $\gamma\delta$. Algunas de las diferencias son:

- El tratamiento (IFN- γ , TNF- α + anticuerpo anti-CD3 monoclonal + IL-1 β + IL-2 + IL-15);

- El fenotipo de las células T $\gamma\delta$ (NKp30- y NKp46-; más aún, 62% de las células T $\gamma\delta$ pertenecen al subtipo V δ 2⁺;
- Menos del 20% de las células T $\gamma\delta$ son CD56⁺;
- Menos del 20% de las células $\gamma\delta$ son CD8⁺;
- Los niveles de expresión de NKp44 no son modulados por la estimulación del complejo $\gamma\delta$ TCR/CD3 (por lo tanto, los mecanismos moleculares diferentes que están involucrados inducen la expresión de NKp44 en aquellas células)

Este documento describe células T $\gamma\delta$ de sangre periférica que expresan NKp44. El NKp44 fue funcional y estaba implicado en el reconocimiento y la eliminación de células tumorales (células de mieloma). Sin embargo, sólo $8 \pm 7\%$ de las células T $\gamma\delta$ expresó NKp44 y la mayoría (62%) de células T $\gamma\delta$ pertenecían al subtipo V δ 2⁺ (que eran V δ 1⁻). Los NKp30 y NKp46 no fueron expresados por células T $\gamma\delta$, y menos del 20% de estas células eran CD8⁺ o CD56⁺.

Por lo tanto, la estirpe de células T $\gamma\delta$ descrita es totalmente diferente de nuestra estirpe de células T $\gamma\delta$ identificada: normalmente más del 95% de las células T $\gamma\delta$ en nuestra estirpe de células pertenecen al subtipo V δ 1⁺ y un alto porcentaje de estas células T V δ 1⁺ $\gamma\delta$ (normalmente más de 30%) expresan NKp44 funcional. Es importante destacar que, el NKp44 demuestra sinergismo con NKp30 para mejorar en gran medida la capacidad de reconocer y destruir las células tumorales (Figura 5B). Esta cooperación entre el NCR es crítica para obtener el efecto deseado (eliminación de la enfermedad del cáncer), y está ausente en las células T NKp44⁺ $\gamma\delta$ previamente identificadas.

El documento escrito Rey, J., C. Veuillen, et al. (2009). "Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors." Trends Mol Med 15(6): 275-284, divulga la expresión común del receptor NKG2D sobre células NK y sobre células T $\gamma\delta$. Este documento también establece que la expansión y activación de las células T $\gamma\delta$ pueden generar respuestas antitumorales. Sin embargo, contrariamente a la presente invención, las células $\gamma\delta$ son NKp30⁻ y NKp46⁻.

El documento WO 00/44893 (Palmetto Richland Memorial Hos) divulga un método de tratamiento de la leucemia basada en la administración de los linfocitos T $\gamma\delta$ sustancialmente purificados. El método comprende la preparación de activación de linfocitos y la expansión del mismo. Las principales diferencias son:

- El tratamiento (anticuerpos anti-TCR inmovilizados unidos a la placa + células B de tumor "alimentadoras" irradiados);
- Las células T $\gamma\delta$ (NKp30-, NKp44-, NKp46-, CD8-).

El documento WO 2011/053750 (Emory University) divulga un método para reducir el cáncer en un paciente, que comprende las etapas de aislar una población de células citotóxicas, como las células T $\gamma\delta$; la administración del agente terapéutico y las células citotóxicas. La principal diferencia con la presente invención es que las células T $\gamma\delta$ se modifican genéticamente para resistir a los agentes quimioterapéuticos.

Resumen

La presente invención se refiere a una estirpe celular de linfocitos de sangre periférica que comprenden células T V δ 1⁺ $\gamma\delta$ que expresan receptores de citotoxicidad natural funcional (NCR), en los que los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp30.

En una realización más preferida, la estirpe celular divulgada puede comprender adicionalmente células T V δ 2⁺ $\gamma\delta$.

Otra realización más preferida de la estirpe celular divulgada, los receptores de citotoxicidad natural deben comprender adicionalmente NKp44, NKp46, o mezclas de los mismos.

Otra realización preferida de la estirpe celular divulgada, la estirpe celular puede expresar la granzima B.

La materia objeto divulgada incluye adicionalmente una composición con dicha estirpe celular. En una realización preferida, la composición es un inyectable. En una realización preferida la composición inyectable comprende una población de células compuestas de más de 80%, a saber más de 80%, 85%, 90%, 95%, de células T V δ 1⁺ $\gamma\delta$ funcionales que expresan receptores de citotoxicidad natural funcional, más preferiblemente los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp30 y, en los que se comprende más de 100 millones de células T V δ 1⁺ $\gamma\delta$ que expresan receptores de citotoxicidad natural funcional. Preferiblemente la composición también comprende un agente o portador farmacéuticamente aceptable y, más preferiblemente, un agente de estabilización, a saber como albúmina de suero humano. Las células son preferiblemente autólogas, es decir, derivadas de una misma

preparación biológica (o de un mismo donante). Más preferiblemente, se obtienen por un método tal como el método descrito por la materia objeto divulgada.

Otro aspecto de la materia objeto divulgada es el uso en medicina de la composición que comprende células de la estirpe celular divulgada en la presente invención.

- 5 En una realización más preferida, la composición divulgada en la presente invención se puede utilizar en la terapia celular adoptiva autóloga o heteróloga, tratamiento de tumor o cáncer, inmunoterapia de tumor o cáncer, y/o tratamiento de leucemia, o para tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de burkitt, linfoma folicular, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga, carcinoma de células
10 renales, o melanoma de piel, entre otros.

En una realización más preferida, la composición divulgada en la presente invención se puede utilizar en el tratamiento de una infección viral. A saber, cuando el virus tratado es de la familia Herpesviridae o Retroviridae, entre otros.

- 15 La materia objeto divulgada incluye adicionalmente un método para producir la estirpe celular descrita que comprende aislar PBL de $\gamma\delta$. En una realización preferida, la muestra de partida puede ser sangre que incluye la muestra de sangre periférica o fracción del mismo, que incluye células de la capa leucocitaria, células mononucleares y células mononucleares de baja densidad. Las células se pueden obtener de una muestra de partida de sangre utilizando técnicas coincidas en la materia tal como centrifugación de gradiente de densidad. Los PBL $\gamma\delta$ totales se pueden aislar a través de selección positiva con anticuerpos anti-TCR $\gamma\delta^+$ marcados
20 magnéticamente o a través de supresión/eliminación de células TCR $\gamma\delta(-)$. El PBL $\gamma\delta$ se puede mantener en cualquier medio de cultivo de célula de mamífero adecuado tal como RPMI 1640 o IMDM.

- La materia objeto divulgada incluye adicionalmente un método para cultivar estas células en un medio de cultivo adecuado en la presencia de agonistas de $\gamma\delta$ TCR, preferiblemente mediante adición regular (más preferiblemente adición continua de dichos agonistas, preferiblemente soluble o inmovilizado, y en la presencia de por lo menos una
25 citoquina $\gamma\delta$, preferiblemente mediante adición regular (más preferiblemente adición continua de dicha citoquina o citoquinas. Dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas $\gamma\delta$ se agregan a dicho cultivo de células en el tiempo del cultivo y también a través del periodo de cultivo, preferiblemente cada 3-6 días, con el fin de que la concentración de agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas $\gamma\delta$ en dicho cultivo es casi normalmente mayor de cero.

- 30 En una realización preferida, la adición de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas $\gamma\delta$ se puede llevar a cabo hasta que se por lo menos 40% de las células expresan receptores de citotoxicidad natural, más preferiblemente por lo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%. En una realización más preferida, la adición de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas $\gamma\delta$ se puede llevar a cabo hasta que se alcanza más de 50 millones, más de 100 millones, más de 200 millones de células viables y funcionales que expresan receptores de citotoxicidad natural, a saber los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp30.

- 35 En una realización más preferida del método divulgado, la adición de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas $\gamma\delta$ se puede llevar a cabo hasta que por lo menos 40% de las células expresan NKp30, más preferiblemente por lo menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 100%.

- En otra realización preferida del método divulgado, el agonista de $\gamma\delta$ TCR puede ser cualquier molécula soluble o inmovilizada que sea capaz de activar, estimular o disparar el complejo del receptor $\gamma\delta$ TCR/CD3 expresado en todo
40 los PBL $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ PBL, que incluyen, pero no se limitan a, lectinas de planta (que incluyen fitohemaglutinina-PHA), anticuerpos monoclonales anti-CD3 (que incluyen OKT3 mAb), anticuerpos monoclonales anti- $\gamma\delta$ TCR o mezclas de los mismos. Se pueden utilizar otros anticuerpos agonistas para el $V\delta 1^+$ $\gamma\delta$ TCR. El término "anticuerpos" incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de variables de cadena sencilla y socios de unión producidos de forma recombinante. Más
45 preferiblemente, el rango de concentración de agonista de $\gamma\delta$ TCR podría variar entre 0.01 a 100 $\mu\text{g/ml}$, incluso más preferiblemente entre 1-5 $\mu\text{g/ml}$.

- En una realización más preferida del método divulgado dicha "citoquina $\gamma\delta$ " significa familia de cadena gamma del receptor de citoquinas común de citocinas, preferiblemente interleuquina, a saber, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21 o mezclas de los mismos, entre otros. La interleuquina utilizada puede ser de origen humano o animal,
50 preferiblemente de origen humano. Puede ser una proteína de tipo sivestre o cualquier fragmento biológicamente activo o variante, es decir, capaz de unirse a su receptor e inducir la activación de las células T $\gamma\delta$ en las condiciones del método de acuerdo con la invención. Más preferiblemente, las citocinas pueden estar en forma soluble, fusionadas o formando complejos con otras moléculas, tales como por ejemplo un péptido, polipéptido o proteína biológicamente activo. Preferiblemente, se utiliza una citoquina $\gamma\delta$ recombinante humana. Más

preferiblemente, el rango de concentración de interleuquina podría variar entre 1-10000 U/ml, incluso más preferiblemente entre 100-1000 U/ml.

En otra realización preferida del método divulgado la adición regular de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas y también se puede realizar durante 2 a 60 días, más preferiblemente entre 9-25 días, incluso más preferiblemente entre 10 a 15 días, a saber 11, 12, 13, 14 días.

Descripción general de la invención

La presente invención describe una estirpe celular de linfocitos de sangre periférica que comprenden células T $\gamma\delta$, composición y método de producción de las mismas, preferencialmente que expresa NKp30, NKp44 y NKp46, para uso en medicina, a saber en inmunoterapia contra el cáncer.

La presente invención divulga un nuevo subgrupo de PBL $\gamma\delta$ V δ 2(-) V δ 1⁺ que expresan receptores de citotoxicidad naturales (NCR) que median directamente la muerte de las estirpes celulares de leucemia y las células neoplásicas de pacientes con leucemia linfocítica crónica. Se muestra que las células T NCR⁺ V δ 1⁺ pueden ser diferenciadas y expandir de PBL $\gamma\delta$ total luego de estimulación con citoquinas y agonistas pan-TCR, a través de un proceso que requiere la señalización de PI-3K/AKT funcional. Sorprendentemente, este subgrupo de forma estable expresa NKp30, NKp44 y NKp46, y altos niveles de granzima B que se asocian con la citotoxicidad mejorada contra células de leucemia linfocítica. La ganancia específica de función y pérdida de la función de experimentos demuestran que los NKp30 y NKp44, pero no NKp46, desempeñan funciones no redundantes y sinérgicas en el reconocimiento celular de leucemia independiente de TCR. Por lo tanto, las células T NCR⁺ V δ 1⁺ constituyen una población de linfocitos citotóxicos inducibles y especializados para inmunoterapia celular adoptiva del cáncer humano.

Descripción de las figuras

Las siguientes figuras proporcionan realizaciones preferidas para ilustrar la descripción y no se deben ver como una limitación del alcance de la invención.

Figura 1a, 1b, 1c- Citotoxicidad anti-leucemia mejorada de cultivos de PBL $\gamma\delta$ activados con mitógeno de células T pan. (A) Los linfocitos $\gamma\delta$ de sangre periférica (PBLs $\gamma\delta$) fueron clasificados con MACS a partir de la sangre periférica de voluntarios sanos (panel izquierdo), y se estimularon con HMB-PP/IL-2 o PHA/IL-2 durante 4 a 19 días. La activación se evaluó mediante citometría de flujo para regulación por aumento de CD69 (paneles centrales; los niveles en células de control recién aislados están sombreados) y dilución CFSE (paneles derechos; la línea de puntos indica los niveles de CFSE iniciales). (B-C) PBL $\gamma\delta$ pre-activados (durante 14 días, como en A) se coinubaron con células de leucemia marcadas con DDAOse durante 3 horas. La lisis de células tumorales se evaluó por tinción con Anexina-V mediante citometría de flujo. (B) Resultados representativos de 6 donantes diferentes para la estirpe celular de leucemia BV173. Los porcentajes se refieren a las células tumorales de Anexina-V⁺. La apoptosis de células tumorales basales (en ausencia de PBL $\gamma\delta$) fue <5%. (C) Resumen de los resultados de 6 donantes diferentes con 4 estirpes celulares objetivo de la leucemia. Las barras de error representan SD (n = 6, *p<0.05; **p<0.01). (D) Cuantificación por PCR en tiempo real de los niveles de mRNA de GzmB en PBL $\gamma\delta$ HMB-PP/IL-2-activado y PHA/IL-2-activado, aislados recientemente. Los datos de esta figura son representativos de 2 a 3 experimentos independientes con resultados similares.

Figura 2a, 2b, 2c - Inducción de la expresión del receptor de citotoxicidad natural en PBLs $\gamma\delta$ activados con mitógeno de las células T-pan. Los PBL $\gamma\delta$ se cultivaron como se describe en la Figura 1 durante 4 a 19 días, y se analizaron por citometría de flujo para la expresión superficial de diversos receptores NK. (A) Resultados para NKG2D, 2B4 y DNAM-1 en cultivos de 10 días activados ya sea con HMB-PP/IL-2 (gris) o PHA/IL-2 (negro), derivados de 6 donantes sanos independientes. Las barras de error representan la DE (n = 6; p>0.05). (B) Expresión de NKp30 en los mismos cultivos de (A). Las gráficas FACS corresponden a cultivos derivados de 3 donantes individuales. Los porcentajes se refieren a PBLs $\gamma\delta$ NKp30⁺. La tinción de control de isotipo se presenta en la Figura 7. (C-D) Cuantificación por PCR en tiempo real de los niveles de ARNm de NKp44 (C) y NKp46 (D) en PBL $\gamma\delta$ HMB-PP/ activa-IL-2 activado y PHA/IL-2 activado recientemente aislado. (E) Evolución del porcentaje de células NKp30⁺ en los cultivos descritos en (A), analizados hasta el día 19. Las barras de error representan la DE (n=6; p>0.05). (B) Expresión de NKp30 en los mismos cultivos de (A). Las gráficas de FACS corresponden a cultivos derivados de 3 donantes individuales. Los porcentajes se refieren a PBLs NKp30⁺ $\gamma\delta$. El teñido de control de isotipo se presenta en la Figura 7. (C-D) Cuantificación por PCR en tiempo real de niveles de mRNA de Nkp44 (C) y Nkp46 (D) en PBL $\gamma\delta$ de HMB-PP/ IL-2-activado y PHA/ IL-2-activado, frescamente aislados. (E) Evolución de los porcentajes de células NKp30⁺ en los cultivos descritos en (A), analizados hasta día 19. Las barras de error representan la DE (n=5). (F) Inducción de expresión de NKp30 en PBL $\gamma\delta$ total o en PBL $\gamma\delta$ NKp30(-) clasificado con FACS (>99% puro) de cultivos de PBL $\gamma\delta$ de PHA/ IL-2-activado (como en B). Las células se estimularon con PHA/ IL-2 durante 14 días. Los datos en esta figura son representativos de 2 a 4 experimentos independientes con resultados similares.

Figura 3a, 3b – Los receptores de citotoxicidad natural se expresan selectivamente sobre la proliferación de células T Vδ1⁺. (A) los PBL γδ se marcaron con CFSE y se cultivaron como se describe en la Figura 1, o en la ausencia de mitógenos de célula T (es decir, IL-2 solo). El análisis de citometría de flujo de dilución de CFSE y la expresión de TCR Vδ2 después de 7 días en cultivo. (B) Porcentaje de células Vδ1⁺ o Vδ2⁺ entre los PBL γδ totales cultivados hasta 19 días con PHA/IL-2. Las barras de error representan la DE (n=3). (C) expresión de NKp30 en subgrupos de PBL γδ de PHA/IL-2-activados. Las células Vδ1⁺ o Vδ2⁺ se clasificaron con FACS de sangre periférica, marcada con CFSE y cultivada con PHA/IL-2 durante 7 días. Los porcentajes se refieren a células NKp30⁺ dentro de cada división (de acuerdo con los niveles CFSE e indicados por rectángulos verticales). (D) Expresión de NKp30, NKp44 y NKp46 en células T Vδ1⁺ después de 19 días de estimulación PHA/ IL-2. También se mostraron los teñidos de control mAb de isotipo. Los datos en esta figura son representativos de 2 a 3 experimentos independientes con resultados similares.

Figura 4a, 4b – La citoquina γδ dependiente de AKT y señales TCR inducen la expresión de NKp30 en células T Vδ1⁺. (A-B) El análisis de citometría de flujo de la expresión de NKp30 sobre células T Vδ1⁺ preseparadas de cultivos de PBL γδ después de 7 días en la presencia de IL-2 o IL-15, solo o en combinación con PHA o OKT3 (anti-CD3 mAb). (C) Efecto de bloquear mAb anti-TCRγδ sobre inducción NKp30 en PBL γδ de PHA/IL-2-activado. Las células NKp30⁺ preseparadas se somborean con gris en cultivos de control de 7 días. (D) Efecto de los inhibidores químicos LY294002 y UO126 sobre inducción NKp30 en PBL γδ de PHA/IL-2-activado, premarcados con CFSE. Los datos en esta figura son representativos de 2 a 3 experimentos independientes con resultados similares.

Figura 5 – Los NKp30 y NKp44 median la destrucción de células tumorales mediante PBL γδ NCR⁺. (A) Evaluación funcional de NKp30, NKp44 y NKp46 utilizando anticuerpos monoclonales específicos en un ensayo de destrucción redirigido de liberación de ⁵¹Cr de 4 horas (en relación de efector: objetivo 2:1) de la estirpe de células objetivo FcyR⁺ P815 por PBLs γδ activados y expandidos con PHA/IL-2. Los datos se presentan como media y de 8 experimentos independientes realizados por triplicado (*p<0.05, ***p<0.001; ns = no significativo estadísticamente). (B) Efecto de anticuerpos bloqueantes a NKp30, NKp44 y NKp46 (o control de isotipo de control de IgG1) en ensayos de destrucción de la estirpe celular de leucemia Molt-4 por PBLs γδ activados y ampliados con PHA/IL-2. Donde se indique, también se agregó el bloqueo mAb anti-TCRγδ (TCR). La muerte celular del tumor se evaluó mediante teñido con anexina-V tal como se describe en la Figura 1. Las barras de error representan la DE (n = 3, **p<0.01; ***p<0.001).

Figura 6a, 6b – Los PBL γδ NCR⁺ son un subgrupo estable dotado de citotoxicidad mejorada contra leucemias linfocíticas primarias. Los PBLs γδ NKp30⁺ y NKp30⁽⁻⁾ se clasificaron con FACS de cultivos de PHA/IL- 2 activados con IL-2 de 14 días. (A) Re-análisis de la expresión de NKp30 en las poblaciones purificadas. (B) Cuantificación por PCR en tiempo real de niveles de mRNA de Nkp44 (izquierda) y Nkp46 (derecha) en células T γδ de NKp30⁽⁻⁾ o NKp30⁺, en comparación con los PBL γδ aislados recientemente. Las barras de error representan la DE (n=3). (C) Los PBL NKp30⁺ γδ clasificados se cultivaron en la presencia de IL-2. Análisis de expresión de NKp30, NKp44 y NKp46 después de 14 días. (D) Se utilizaron células T γδ de NKp30⁽⁻⁾ o NKp30⁺, o los PBL γδ aislados recientemente, en ensayos de destrucción con la estirpe celular de leucemia Bv173 (como en la Figura 1). La muerte de las células tumorales se evaluó mediante teñido con Anexina V (n=3, *p<0.05). (E) Cuantificación por PCR en tiempo real de niveles de mRNA de GzmB en células T γδ NKp30⁽⁻⁾ o NKp30⁺ recientemente aisladas. Las barras de error representan la DE (n=3). (F-G) Gráficas representativas (F) y resumen de datos (G) para 5 muestras de leucemia linfocítica crónica de células B primarias que se utilizan en ensayos de destrucción (como en la Figura 1) con los PBL γδ obtenidos de 6 donantes distintos y activados con cualquiera de HMB-PP/IL-2 o PHA/IL-2. Los PBL γδ NCR⁽⁻⁾ de cultivos HMB-PP/IL-2-activados (barras grises) se compararon con PBL γδ NCR⁽⁺⁾ de cultivos de PHA/IL-2-activados (barras negras). Las barras de error representan la DE (n=6, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Figura 7 - Teñido de control de isotipo para NKp30 en PBL γδ de PHA/IL-2-activado. Citometría de flujo de teñido de IgG1 en células TCRγδ⁺ separadas de los cultivos de PBL descritos en las Figuras 1-2. Los datos son representativos de 6 experimentos independientes.

Figura 8 – Los PBL Vγ9Vδ2 no son preferencialmente susceptibles a apoptosis inducida por PHA. Los PBL γδ se cultivaron con HMB-PP/IL-2 o PHA/IL-2 como se describe en las Figuras 1 y 3. Se analizaron las células con Anexina-V+ apoptóticas dentro de células Vδ2⁺ preseparadas después de 7 días en cultivo mediante citometría de flujo.

Figura 9 – Enriquecimiento de célula T de Vδ1⁺ en cultivos de PBL γδ activados con PHA/IL-2. Los PBL γδ se cultivaron con PHA/IL-2 durante 19 días, como se describe en las Figuras 1 y 3, y se analizaron mediante citometría de flujo para expresión de Vδ1 TCR y CD3.

Figura 10 - Los PBL γδ aislados recientemente no expresan NKp30. Datos de citometría de flujo para expresión de NKp30 y Vδ1 TCR en los PBL γδ aislados recientemente de dos donantes saludables. Los datos son representativos de quince diferentes donantes saludables.

Figura 11 – Las señales de TCR más IL-2 inducen la expresión de NKp30 en la proliferación de células T V δ 1⁺. Expresión de NKp30 en células T V δ 1⁺, clasificadas con FACS de sangre periférica, marcadas con CFSE y cultivadas con o sin OKT3 mAb y IL-2 durante 7 días.

Figura 12 – Aumento de expresión de CD56 en PBL de NCR⁺ V δ 1⁺. Datos de citometría de flujo para expresión de CD56 y CD27 en PBL de V δ 1⁺ activados con PHA/IL-2 durante 19 días y separados ya sea con células NKp30⁺ o NKp30⁽⁻⁾.

Figura 13 – El B7h6 no se sobreexpresa en la mayoría de las muestras de leucemia linfocítica. Datos de PCR cuantitativo en tiempo real para expresión de B7h6 sobre (A) estirpes celulares de leucemia linfoblástica aguda; (B) muestras de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de célula T; (C) muestras de pacientes con leucemia linfocítica crónica de célula B. Los PBMC frescos sanos se muestran como referencia (línea discontinua). Los niveles de B7h6 se normalizaron a los genes de limpieza Gusb y Psmb6 y se expresaron en unidades arbitrarias. Las barras de error representan la de mediciones por triplicado.

Figura 14 – Fenotipo de los PBL $\gamma\delta$ en cultivos de PHA/IL-2-activados. Los PBL $\gamma\delta$ se cultivaron con PHA/IL-2 durante 19 días, como se describe en las Figuras 1 y 3, y se analizaron mediante citometría de flujo para (A) expresión de V δ 1 TCR y CD3; (B) expresión de CD11c y CD8. Las células PHA/IL-2-activadas se representan en la línea completa.

Figura 15 – Los PBL NKp30⁺ $\gamma\delta$ son altamente citotóxicos contra células de cáncer de diversos orígenes de tejido. Los linfocitos $\gamma\delta$ de sangre periférica (PBLs $\gamma\delta$) se clasificaron con MACS a partir de la sangre periférica de voluntarios saludables y se estimularon con PHA/IL-2 durante 2 semanas. Los PBL NKp30⁺ $\gamma\delta$ adicionalmente se clasificaron con FACS y se utilizaron en ensayos de destrucción de 3 h con un panel de estirpes celulares de tumor: Leucemia linfoblástica aguda - ALL (RS4-11), Leucemia mielógena aguda - AML (HL- 60), Leucemia mielógena crónica - CML (K562), Leucemia linfocítica crónica - CLL (MEC-1), Mieloma (KMM1), Linfoma de burkitt (RAJI), Linfoma folicular (DOHH2), Carcinoma de mama (MDA231), Carcinoma de pulmón (NCI-H520), Carcinoma de próstata (PC3), Carcinoma de colon (HCT116), Carcinoma de vejiga (UM-UC-3), Carcinoma de células renales (VMRCRCW), Melanoma de piel (MEL-1). La muerte de las células tumorales se evaluó mediante tinte con Anexina V (n=3, *p<0.05).

Descripción detallada de la invención

La materia objeto divulgada se refiere a una estirpe celular de linfocitos de sangre periférica que comprenden células T $\gamma\delta$, composición y método de producción los mismos y el uso en medicina, a saber en tratamiento contra el cáncer. Estas células T $\gamma\delta$ expresan el receptor de células T V δ 1⁺ (TCR) y receptores de citotoxicidad natural funcional (NCRs). Los NCRs se regulan por aumento en células T V δ 1⁺ mediante señales dependientes de AKT proporcionadas sinérgicamente por citoquinas γ_c y V δ 1⁺ TCR.

La invención divulga un subgrupo de PBL V δ 1⁺ novedoso capaz de dirigirse a tumores hematológicos altamente resistentes a PBLs V γ 9V δ 2 completamente activados. Esta población de V δ 1⁺ debe su función destructora especializada a la expresión inducida de los receptores de citotoxicidad naturales, que han sido consideradas principalmente como marcadores específicos a NK. Se muestra que, aunque ni las células V δ 1⁺ ni V δ 2⁺ expresan constitutivamente NCR, estos se pueden regular por aumento selectivamente en las células V δ 1⁺ por señales AKT dependientes proporcionadas sinérgicamente por citoquinas de la familia γ_c y V δ 1⁺ TCR. También se muestra que NKp30 y NKp44 son funcionales en PBLs NCR⁺ V δ 1⁺ y críticamente contribuyen a su orientación mejorada de las células de leucemia linfocítica.

La materia objeto divulgada se refiere a la combinación de citoquinas γ_c y estímulos mitogénicos (PHA o OKT3), para inducir la expresión NCR en un subgrupo de PBL V δ 1⁺ considerable que está dotado con una mayor actividad citolítica contra tumores hematológicos. Aunque el PHA es un mitógeno de las células T no fisiológico, se demuestra que su efecto sobre la inducción NCR estaba completamente imitado por el entrecruzamiento del complejo TCR/CD3 sobre PBL V δ 1⁺. Por lo tanto, la inducción NCR está acoplada a la proliferación mediada por TCR de las células V δ 1⁺, mientras que también requieren señales de citoquinas γ_c .

Entre los NCR inducibles, el NKp30 es el más importante para la actividad antitumor de células T V δ 1⁺, con base en la proporción de células que la expresan (Figura 3D); la mayor mejora en la citotoxicidad de células T V δ 1⁺ sobre la activación de NKp30 (Figura 5A); y la reducción significativa en la muerte de las células de leucemia luego de bloqueo NKp30 (Figura 5B). A pesar de ello, el NKp44 (pero no NKp46) también es funcional en células NCR⁺ V δ 1⁺ (Figura 5A), y parece sinergizar con NKp30 para mejorar la orientación del tumor (Figura 5B).

Tanto NKp30 como NKp44 se han implicado en el reconocimiento de células NK humanas de las células infectadas por virus. En cuanto a los tumores, los experimentos de bloqueo mediados por anticuerpos demostraron un papel

importante en la orientación en mieloma y células de melanoma. Por otra parte, la falta de expresión NCR ha sido clínicamente correlacionada con una pobre supervivencia en pacientes con AML.

Las células T V δ 1⁺ son el subgrupo de células T $\gamma\delta$ predominante durante la vida fetal/temprana, cuando ya son capaces de responder a la infección viral. En los adultos, las expansiones de células T V δ 1⁺ se han asociado con la infección por CMV, infección por VIH-1, y tumores de cualquiera de origen epitelial o hematopoyético. Una posibilidad atractiva para la transferencia adoptiva de células T V δ 1⁺ activadas es que pueden mostrar particularmente buena capacidad para alojar tejidos, ya que, contrariamente a sus circulantes homólogos V δ 2⁺, las células V δ 1⁺ son preferiblemente linfocitos asociados a tejido (Groh, Spies, Ciencia 1998). Curiosamente, la abundancia de células T V δ 1⁺ en las superficies mucosas se ha atribuido a IL-15, lo que induce modificaciones de la cromatina que controla el reordenamiento del gen TCR.

La presente invención describe que las células de NCR⁺ V δ 1⁺ son capaces de atacar a las células leucémicas linfoides primarias, lo cual es especialmente interesante teniendo en cuenta que se ha reportado anteriormente que las células T V δ 1⁺ son citotóxicas ineficientes de células de leucemia o linfoma primario. La presente invención también divulga la expansión preferencial de las células T V δ 1⁺ (entre PBL $\gamma\delta$) luego del tratamiento con PHA in vitro (Figura 3B). Dado que esto no se debe a la apoptosis selectiva de los homólogos V δ 2⁺ dominantes (Figura 8), se debe derivar de una ventaja proliferativa de las células V δ 1⁺ cuando se reciben señales de TCR dependientes de PHA (Figuras 3A-B). Se observó previamente que las células T V δ 1⁺ expresan niveles significativamente más altos del correceptor CD27 (cuando se compara con células V δ 2⁺). En los humanos y ratones, la estimulación de CD27 aumenta la expresión de ciclina D2 y promueve proliferación de células $\gamma\delta$ T in vitro e in vivo.

La invención describe que la inducción eficiente de la expresión de NCR sobre células V δ 1⁺ depende de la estimulación de TCR; en su ausencia, las citoquinas γ_c sólo pueden efectuar una muy modesta regulación positiva de expresión de NCR (Figuras 4A-B). Por lo tanto, las señales de TCR están corriente arriba del reconocimiento de células tumorales mediada por NCR mediante linfocitos NCR⁺ V δ 1⁺.

En una perspectiva clínica, esta invención describe un método para inducir NCR ex vivo, y una forma muy factible para expandir e inyectar grandes cantidades de células en pacientes. El estado de activación de estas células potencialmente se podría mantener in vivo, mediante la administración de dosis bajas de IL-2, que parece ser suficiente para sostener la expresión de NCR.

Las células T NKp30⁺ $\gamma\delta$ PHA/IL-2 activadas preferiblemente expresan CD11c y CD8. La CD11c es una molécula de adhesión expresada generalmente en otros linfocitos y se ha demostrado que está implicada en el reconocimiento de células tumorales.

Materiales y métodos

Aislamiento de células T $\gamma\delta$ de sangre periférica humana. Se recogió sangre periférica de voluntarios sanos anónimos, se diluyó 1:1 (v/v) con PBS (preferiblemente, Invitrogen Gibco) y se centrifugó preferiblemente, en Ficoll-Paque (preferiblemente, Histopaque-1077, Sigma) en una relación en volumen de 1:3 (1 parte de ficol para 3 de sangre diluida) durante 30 minutos a 1500 rpm y 25°C. Se recogió la interfaz que contenía las células mononucleares y se lavó (en PBS), y se aislaron las células T $\gamma\delta$ (por encima de 95% de pureza) mediante clasificación celular magnética a través de la selección positiva (preferiblemente, con un anticuerpo anti-TCR $\gamma\delta$ marcado con FITC) o a través de selección negativa (con un cóctel de anticuerpos marcados con biotina; preferiblemente, Miltenyi Biotec).

Cultivo celular. PBLs $\gamma\delta$ aislados se cultivaron a 10⁶ células/mL a 37°C, 5% de CO₂ en placas de fondo redondo de 96 pozos con RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM (preferiblemente, Invitrogen Gibco) suplementada con suero bovino fetal al 10% (preferiblemente, Invitrogen Gibco), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen Gibco), 50 mg/mL de penicilina/estreptomicina (preferiblemente, Invitrogen Gibco). Las células se expandieron en presencia de 100 U/ml de rIL-2 (preferiblemente, Roche Applied Science), con o sin HMB-PP 10 nM (pirofosfato de 4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo, preferiblemente, Echelon Biosciences) y 1 μ g/mL de fitohemaglutinina (PHA; preferiblemente, Sigma-Aldrich). Se lavaron las células y el medio de cultivo se sustituyó cada 5-6 días. Para estudiar la inducción de la expresión de NKp30, los PBL $\gamma\delta$ se cultivaron en la presencia o ausencia de 100 U/ml de rIL2 (preferiblemente, Roche Applied Science), 1 μ g/ml de anticuerpo anti-CD3 soluble (preferiblemente, eBioscience, clon OKT3) y 20 ng/ml de rIL-15 (preferiblemente, Biolegend). Para el bloqueo TCR, $\gamma\delta$ PBL recién aislados se marcaron con CFSE y después se incubaron durante 7 días con anti-TCR $\gamma\delta$ (preferiblemente, Beckman Coulter, clon IMMU510) se diluyeron 1:20 en medio completo suplementado con 1 μ g/mL de PHA y 100 U/ml de rIL2. Para estudiar los efectos de los inhibidores químicos de la transducción de señal, el inhibidor de MEK UO126 y el inhibidor de PI-3K LY294002 (preferiblemente, ambos de Calbiochem) se agregaron a 10 mM durante un periodo de incubación de 2 horas y después se mantuvieron en cultivo con 100 U/ml de rIL2 y PHA 1 μ g/ml durante 7 días.

Clasificación de células mediante citometría de flujo. Para la clasificación de los PBL $\gamma\delta$ basado en la expresión de NKp30 y V δ 1⁺ TCR, las células de cultivos PHA/IL-2- activados se tiñeron con anti-NKp30 (preferiblemente, Biolegend, clon P30-15), anti-V δ 1 (preferiblemente, Thermo Fisher Scientific, TS8.2) y ordenados en un clasificador de células FACSaria (clon preferiblemente, BD Biosciences).

- 5 Muestras de pacientes de leucemia. Las células de leucemia linfocítica crónica de células B se obtuvieron de la sangre periférica de los pacientes en la presentación, luego de consentimiento informado y la aprobación del comité institucional de revisión (Instituto Portugués de Oncología de Lisboa, Portugal). Las muestras fueron enriquecidas por centrifugación de densidad sobre Ficol-Paque y después se lavaron dos veces en RPMI 1640 al 10% (como anteriormente).
- 10 Ensayos in vitro de destrucción tumor. Todas las estirpes celulares tumorales se cultivaron en RPMI 1640 al 10% completo (como anteriormente), se mantuvo a 10^5 hasta 10^6 células/mL mediante dilución y la división de 1:3 cada 3-4 días. Para los ensayos de citotoxicidad, los PBL $\gamma\delta$ magnéticamente purificados se preactivaron durante 7-19 días en presencia de IL-2 (100 U/mL) y, cualquiera de 1 μ g/mL de PHA o HMB-PÉPTIDO 10 nM. Para el bloqueo del receptor, los PBL $\gamma\delta$ se incubaron durante 2 h con los anticuerpos de bloqueo anti-NKp30 (clon F252), anti-NKp44 (clon KS38), anti-NKp46 (clon KL247) o anti-TCR $\gamma\delta$ (Beckman Coulter, clon IMMU510). Los anticuerpos de bloqueo se mantuvieron en el medio de cultivo durante los ensayos de destrucción. Las estirpes de células tumorales o muestras primarias de leucemia se tiñeron con Cell-Trace Far Red DDAOSE (1 μ M; Molecular Probes, preferiblemente, Invitrogen) y cada 3×10^4 células tumorales se incubaron con 3×10^5 células T $\gamma\delta$ en RPMI, durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂ en una placa de 96 pozos de fondo redondo. Las células se tiñeron con anexina V-FITC (preferiblemente, BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo. Para los ensayos de destrucción redirigidos, los PBL $\gamma\delta$ PHA/IL-2-activados se incubaron durante 4 horas con los agonistas NCR anti-NKp30 (clon AZ20), anti-NKp44 (clon Z231) o anti-NKp46 (clon Bab281) durante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar.

- 25 Análisis de citometría de flujo. Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales fluorescentes: anti-CD3-PerCP-Cy5.5 (preferiblemente, eBioscience, clon OKT3), anti-TCR $\gamma\delta$ -FITC (preferiblemente, eBioscience, clon B1.1), anti-CD69-PE (preferiblemente, BD Pharmingen, clon FN50), anti-NKG2D-PE/Cy7 (Biolegend, clon 1D11), anti-2B4-APC (preferiblemente, Biolegend, clon C1.7), anti-ADNM-1-Alexa-Fluor647 (Biolegend, clon DX11), anti-NKp30-APC (preferiblemente, Biolegend, clon P30-15), anti-V δ 2 TCR-PE (preferiblemente, Biolegend, clon B6), anti-NKp44-APC (preferiblemente, Biolegend, clon P44-8), anti-NKp46- AlexaFluor647 (preferiblemente, Biolegend, clon 9E2), anti-V δ 1 TCR -FITC (preferiblemente, Thermo Fisher Scientific, clon TS8.2), anti-NKp30-PE (preferiblemente, Biolegend, clon P30-15), isotipo Ctrl IgG1k-APC anti-ratón (preferiblemente, Biolegend, clon MOPC-21), isotipo Ctrl IgG1k-PE anti-ratón (preferiblemente, Biolegend, clon MOPC-21), anti-CD27-APC/Cy7 (preferiblemente, Biolegend, clon 0323), anti-CD56-APC (preferiblemente, Biolegend, clon HCD56). La proliferación celular se midió siguiendo un protocolo estándar de tefido CFSE (preferiblemente, Kit proliferación celular CellTrace CFSE, Invitrogen; concentración final 0.5 mM), mientras que la apoptosis se evaluó mediante tefido con AnnexinaV-FITC (preferiblemente, BD Pharmingen). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto (preferiblemente, BD Biosciences).

- 40 Aislamiento de ARN y producción de cADN. El ARN total fue extraído utilizando el Kit RNeasy Mini de acuerdo con el protocolo del fabricante (preferiblemente, Qiagen, Hilden, Alemania). La concentración y la pureza se determinó mediante espectrofotometría y la integridad se confirmó utilizando un Bioanalizador Agilent 2100 con un Ensayo RNA 6000 Nano (preferiblemente, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El ARN total se transcribió a la inversa en cADN utilizando hexámeros aleatorios y reactivos de síntesis de primera hebra Superscript II (preferiblemente, Invitrogen).

- 45 PCR en tiempo real cuantitativo (qPCR). El qPCR se realizó en Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7500 FAST utilizando el sistema de detección SYBR Green (preferiblemente, ambos de Applied Biosystems). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa en línea Primer3 v.0.4.0 (<http://primer3.sourceforge.net>). Para cada transcripción, la cuantificación se realizó utilizando el método de la curva de calibración. Se utilizaron β_2 -microglobulina (b2m), glucoronidasa beta (Gusb) y la subunidad del proteasoma beta tipo 6 (Psm6) como controles de limpieza para la normalización de la expresión génica. Se utilizaron los cebadores siguientes:

- b2m - directo CTAT CCAG CGTA CTCC AAAG ATTC, inverso CTTG CTGA AAGA CAAG TCTG AATG;
- Psm6 - directo GGCG GCTA CCTT ACTA GCTG, inverso AAAC TGCA CGGC CATG ATA;
- 50 • Gusb - directo TGCA GCGG TGTA CTTC TG, inverso CCTT GACA GAGA TCTG GTAA TCA;
- B7-H6 - directo TCAC CAAG AGGC ATTC CGAC CT, inverso ACCA CCTC ACAT CGGT ACTC TC;
- Nkp44 - directo CCGT CAGA TTCT ATCT GGTG GT, inverso CACA CAGC TCTG GGTC TGG;
- Nkp46 - directo AAGA CCCC ACCT TTCC TGA, inverso TGCT GGCT CGCT CTCT AGT;

• Gzmb- directo GGGG GACC CAGA GATT AAAA, inverso CCAT TGTT TCGT CCAT AGGA G.

Todas las muestras se realizaron por triplicado y se repitieron tres veces. El análisis de los resultados qPCR se realizó utilizando el software de análisis de secuencia ABI v1.1 SDS (Applied Biosystems).

5 Análisis estadístico. Las diferencias entre subpoblaciones se evaluaron utilizando la prueba t de Student y se indicó cuando fue significativo como *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Resultados

Citotoxicidad mejorada de cultivos de PBL γδ activados con mitógeno de células T-pan

10 Se comparó capacidad de destrucción antitumoral de cultivos de PBL γδ (siempre mantenidos en presencia de IL-2) activado, ya sea con PHA, una lectina vegetal que actúa como un mitógeno de células T potente, o la específica Vy9Vδ2 TCR agonista HMB-PP (Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., and Wang, H. 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Immunol Rev 215:59-76). Aunque ambos regímenes fueron igualmente eficientes en la activación de PBLs γδ, según se evaluó por la proliferación celular y la regulación positiva de CD69 (Figura 1A), se observó que las muestras activadas con PHA fueron consistentemente mejores destructores de estirpes de células tumorales hematopoyéticas que las muestras (del mismo origen donante) 15 estimuladas con HMB-PP (Figura 1B-C). Esto fue válido en todos los donantes probados (Figura 1B) y se asoció con una mayor expresión de granzima B (Figura 1D), un componente clave de la maquinaria de linfocitos citolíticos. Es de destacar que los PBLs γδ recientemente aislados carecen de la expresión de B granzima (Figura 1D), que muestra muy pobre citotoxicidad antileucemia (<10% de destrucción), como se reportó anteriormente.

20 La función citotóxica superior de los cultivos de PBL γδ estimulados con PHA fue un hallazgo sorprendente, ya que se muestra que el HMB-PP es un muy potente activador del subgrupo PBL Vy9Vδ2 altamente dominante (Morita, C.T., Jin, C., Sarikonda, G., and Wang, H. 2007. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. Immunol Rev 215:59-76). En comparación con PBL γδ activado con HMBPP, los cultivos 25 estimulados con PHA mostraron citotoxicidad mejorada frente a diversas estirpes celulares de leucemia resistentes, tales como Bv-173, REH o HPB-ALL (Figuras 1B-C), que se ha demostrado carecen de expresión del ligando NKG2D crítico ULBP1. Estos datos demuestran que el mitógeno PHA de células T-pan es capaz de aumentar el potencial citolítico de cultivos de PBL γδ a medio plazo (1-3 semanas), que podrían ser de gran valor para la inmunoterapia celular adoptiva.

30 Inducción de la expresión de NCR en PBLs γδ activados con mitógeno de células T-pan

Se investigó el mecanismo subyacente a la citotoxicidad mejorada de cultivos de PBL γδ activados con PHA. Los datos anteriores se podrían explicar por la expresión diferencial de receptores tales como NKG2D o DNAM- 1 o 2B4. Todos fueron previamente mostrados para participar en el reconocimiento de células tumorales por linfocitos citotóxicos. Sin embargo, ninguno de estos candidatos se expresó diferencialmente entre cultivos de PBL γδ PHA y 35 HMB-PP-activados (Figura 2A). Por el contrario, y de forma inesperada, el receptor de citotoxicidad natural de NKp30, un activador importante de la citotoxicidad de células NK, se encontró específicamente en PBLs γδ estimulados con PHA (Figura 2B; Figura 7). Adicionalmente, los otros miembros de la familia de NCR, NKp44 y NKp46, también se expresaron de forma selectiva en estas muestras (Figuras 2C-D; véase a continuación).

40 La proporción de células NKp30⁺ aumentó de forma constante con el tiempo de cultivo (Figura 2E), lo que sugiere una asociación de inducción NKp30 con la proliferación celular. Aunque es poco probable debido al muy bajo fondo en muestras frescas (Figura 2E), fue posible que un subgrupo de minutos que expresan constitutivamente NKp30 preferiblemente se podrían ampliar en cultivos de PBL γδ estimulados con PHA. Para abordar esto, se realizaron experimentos con células NKp30⁽⁻⁾ altamente purificadas con FACS (> 99%), lo que demostró que las células NKp30⁽⁻⁾ fueron capaces de adquirir expresión NKp30 tan eficientemente como las células no clasificadas luego de 45 estimulación de PHA + IL-2 (Figura 2F). Más aún, bajo dichas condiciones, las células NKp30⁽⁻⁾ y NKp30⁺ proliferaron a medida similar, argumentando aún más contra la expansión preferencial de las células NKp30⁺ bajo dichas condiciones. Estos resultados sugieren que la expresión de NKp30 se induce de novo luego de activación PBL γδ mediante tratamiento PHA/IL-2, que está acoplado a la proliferación celular.

Los NCR se expresan selectivamente al proliferar células T Vδ1⁺

50 Teniendo en cuenta, se ha mostrado que el HMB-PP es un agonista óptimo de células Vy9Vδ2, aunque, por el contrario con HMB-PP, el tratamiento con células Vδ2⁽⁻⁾ preferiblemente se expande con PHA entre PBL γδ (Figura 3A). Esto no se debe a diferencias en la apoptosis de las células Vδ2⁺ en las dos condiciones experimentales (Figura 8). La población Vδ2⁽⁻⁾ que tiene mayores probabilidades para expandir de manera muy significativa (Figura

3A) eran células V δ 1⁺, ya que otros subgrupos son muy raros en la sangre periférica de adultos sanos. Cuando se evaluó el uso TCR de V δ 1 frente a V δ 2, se encontró un dramático enriquecimiento de células V δ 1⁺ en cultivos activados por PHA (>80% de todas las células T $\gamma\delta$ después de 19 días) (Figura 3B; Figura 9). Por el contrario, y como se ha descrito, los cultivos activados con HMB-PP fueron dominados progresivamente por células V δ 2⁺ (Figura 3A).

La inducción de la expresión de NKp30 se examinó en cultivos paralelos de células V δ 1⁺ o V δ 2⁺ aisladas, que se estimularon con PHA+IL-2. Mientras que las células V δ 1⁺ y V δ 2⁺ recientemente aisladas no expresaron NKp30 (Figura 10), esta NCR se indujo fuertemente (luego de tratamiento con PHA+IL-2) en células V δ 1⁺ pero no en células V δ 2⁺ (Figura 3C). Por otra parte, siguiendo la dilución CFSE se demostró una acumulación notable de células NKp30⁺ con la división progresiva de las células V δ 1⁺ (Figura 3C). Estos datos sugieren que la activación de las células V δ 1⁺ en cultivos PHA/IL-2 induce la expresión de NKp30 de forma concomitante con la proliferación celular.

Aunque porcentajes altos (>50%) de células NKp30⁺ se detectan generalmente después de 2-3 semanas en cultivo, las NKp44 (~30%) y NKp46 (<20%) se expresaron en proporciones más bajas de células V δ 1⁺ (Figura 3D). Adicionalmente, la mayoría de las células NKp44⁺ o NKp46⁺ V δ 1⁺ también expresaron NKp30 (Figura 3D). Por lo tanto se considera NKp30 como el marcador más informativo del subgrupo NCR⁺ V δ 1⁺ inducible.

La inducción de NCR requiere citoquina $\gamma\delta$ dependiente de AKT y señales de TCR

Se diseccionaron las señales específicas requeridas para la diferenciación de células T NCR⁺ V δ 1⁺. En primer lugar, los dos componentes del protocolo de activación, IL-2 y PHA, se disociaron. El IL-2, o su citoquina γ C relacionada, IL-15, solo eran suficiente para inducir alguna expresión de NKp30, pero el efecto fue modesto cuando se compara con combinaciones de PHA/IL-2 (o PHA/IL-15) (Figura 4A). Por otro lado, el PHA solo no fue capaz de mantener a los cultivos viables, consistente con el papel crítico de citoquinas γ C en la supervivencia de células T $\gamma\delta$, particularmente después de activación/proliferación.

A pesar de que el PHA ha sido un mitógeno de células T ampliamente utilizado, también es un compuesto no fisiológico capaz de entrecruzamiento de una serie de receptores de superficie, incluyendo el TCR. Por lo tanto, el mediador molecular de la estimulación PHA podría ser el complejo V δ 1⁺ TCR. Se comparó la capacidad de los PHA y el mAb OKT3, que específicamente enlazan de forma cruzada cadenas CD3 ϵ del complejo TCR, para inducir la expresión de NKp30 (cuando se combina con IL-2 o IL-15) en células T V δ 1⁺. OKT3 fue completamente capaz de imitar PHA en estos ensayos (Figuras 4A-B), induciendo de esta manera el NKp30 en la proliferación de células T V δ 1⁺ (Figura 11). Más aún, el bloqueo de TCR $\gamma\delta$ en cultivos PHA/IL-2 previene la inducción de NKp30 (Figura 4C). Estos datos sugieren que el tratamiento con PHA proporciona señales de TCR para inducir la expresión NCR en PBL V δ 1⁺. Por otra parte, las diferencias entre las citoquinas solas o tratamientos de combinación con OKT3 (o PHA) ponen de manifiesto una sinergia marcada entre las señales de TCR y las citoquinas γ C en este proceso (Figuras 4A-B).

Para explorar adicionalmente los mecanismos moleculares de inducción NCR, se emplearon inhibidores químicos de las principales vías de transducción de señales corriente abajo de los receptores de citoquinas γ C y/o la señalización de TCR. Si bien el bloqueo de señalización JAK activa la muerte celular extensa antes de que cualquier inducción NCR, coincubación con el inhibidor LY294002 PI-3K/AKT impida específicamente la inducción NKp30 en la proliferación de células T V δ 1⁺ (Figura 4D). El AKT está implicado en la transducción de señales de TCR y las citoquinas γ C, que incluyen señales TCR $\gamma\delta$. Por el contrario, el inhibidor UO126 de MAPK/Erk no tuvo efecto detectable sobre la inducción de NKp30 en la proliferación de células T V δ 1⁺ (Figura 4D). Es importante destacar que, el efecto selectivo de LY294002 disocia la inducción NCR de la proliferación celular, demostrando así que la proliferación de células T V δ 1⁺ es necesaria (Figura 3C; Figura 11) pero no suficiente (Figura 4D) para inducir la expresión de NKp30. Colectivamente, estos datos demuestran que las citoquinas γ C dependientes de AKT y las señales de TCR se sinergizan para inducir la expresión de NKp30 en células T V δ 1⁺.

Destrucción de células tumorales con activadores NKp30 y NKp44 mediante PBL V δ 1⁺

Se comprometieron los experimentos de ganancia y pérdida de función para evaluar el impacto de la modulación NCR en cultivos de PBL enriquecidos con V δ 1⁺ (>80%; Figura 9A), que expresan NCR en niveles similares a los de la Figura 3D. En primer lugar, al utilizar un ensayo de citotoxicidad dependiente de Ab inversa, se demostró que el entrecruzamiento de NKp30 o NKp44, pero no NKp46, produce aumentos muy significativos en la lisis de los objetivos de células tumorales P815 (Figura 5A). Estos datos demuestran que la inducida NKp30 y NKp44 son funcionales y median la destrucción de células tumorales. Para evaluar si jugaban papeles no redundantes en la orientación de las células de leucemia, se llevó a cabo experimentos de bloqueo del receptor utilizando mAbs específicos a NCR. Se observaron reducciones significativas en la lisis de células tumorales sobre bloqueo de NKp30 y NKp44 (Figura 5B). Como era de esperar a partir de los resultados en la Figura 5A, el bloqueo de NKp46 no afectó la destrucción de células tumorales. Curiosamente, también se observó claramente un efecto sinérgico entre NKp30 y NKp44. Es de destacar que el bloqueo de TCR $\gamma\delta$ en cualquier entorno (solo o en combinación con mAbs anti-NCR) fue un evento neutral durante el ensayo de mortalidad (Figura 5B). Estos datos sugieren que la

orientación de células de leucemia por PBL NCR⁺ Vδ1⁺s es un evento de independiente de TCR principalmente mediado por la función sinérgica de NKp30 y NKp44.

Los PBL NCR⁺ Vδ1⁺ son citotóxicos especializados que se dirigen a leucemias linfocíticas primarias resistentes

- 5 Para caracterizar completamente el potencial anti-tumor de PBL NCR⁺ Vδ1⁺, las células NKp30⁺ fueron clasificadas con FACS a alto grado de pureza (>99%) (Figura 6A) y se realizaron series de ensayos funcionales. Como era de esperar (Figura 3D), las células NKp30⁺ clasificadas células también expresaron NKp44 y NKp46 (Figura 6B), y los tres NCR fueron en gran medida estables en la superficie de las células purificadas cuando se cultivan durante dos semanas con solo IL-2 (Figura 6C). Estos datos demuestran la expansión factible de un subgrupo de células T NCR⁺ Vδ1⁺ estable.
- 10 Cuando se evaluó la función citotóxica de las células NKp30⁺, se observó un aumento en la orientación de la estirpe celular de leucemia resistente Bv173 (entre otras) (en comparación con NKp30⁽⁻⁾ homólogos) (Figura 6D). Esto se correlaciona con una mayor expresión de granzima B (Figura 6E). Adicionalmente, la expresión de NKp30 también se asocia con un mayor grado de expresión de CD56 (Figura 12), que ha sido previamente vinculada a la citotoxicidad de los linfocitos humanos, que incluyen células T Vδ2⁺.
- 15 Por último, se realizaron ensayos de destrucción funcionales con muestras primarias obtenidas a partir de pacientes con leucemia linfocítica crónica. Es importante destacar que, los PBLs γδ HMB-PP/IL-2- activados no expresaron NCR (Figura 2B). Se comparó su actividad citolítica antitumoral con la de aquellas células de NCR⁺ aisladas de cultivos de PBL γδ activados con PHA/IL-2. Se observó que los PBLs γδ NCR⁺, obtenidos a partir de 6 donantes diferentes, fueron consistentemente más eficiente en la eliminación de células B-CLL primarias (Figuras 6F-G).

20

LISTADO DE SECUENCIACIÓN

<110> INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR

<120> "Estirpe celular de linfocitos que comprende células T gama delta, composición y método de producción de las mismas"

5 <130> PPI 45433
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 24

10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ctatccagcg tactccaaag attc 24
 <210> 2

15 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 cttgctgaaa gacaagtctg aatg 24

20 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

25 ggcggctacc ttactagctg 20
 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 4
 aaactgcacg gccatgata 19

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 5
 tgcagcgggtg tacttctg 18
 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 ccttgacaga gatctggtaa tca 23
 <210> 7
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 tcaccaagag gcattccgac ct 22
 <210> 8
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 accacctcac atcgttactc tc 22
 25 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 30 ccgtcagatt ctatctgggtg gt 22
 <210> 10

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 5 cacacagctc tgggtctgg 19
 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 11
 aagacccac cttctga 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 tgctggctcg ctcttagt 19
 <210> 13
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 gggggacca gagattaa 20
 <210> 14
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 ccattgttc gtccatagga g 21
 30

REIVINDICACIONES

1. Estirpe celular de linfocitos que comprende células T V δ 1⁺ $\gamma\delta$ que expresan receptores de citotoxicidad natural funcional, en la que los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp30.
- 5 2. Estirpe celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas que comprende adicionalmente células T V δ 2⁺ $\gamma\delta$.
3. Estirpe celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas en la que dichos linfocitos son de una muestra de sangre periférica.
4. Estirpe celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas en la que los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp44.
- 10 5. Estirpe celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas en la que los receptores de citotoxicidad natural comprenden NKp46.
6. Estirpe celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas que comprende células que expresan granzima B.
- 15 7. Composición que comprende células de la estirpe celular de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas.
8. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas en la que la composición es un inyectable.
9. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas para el uso en medicina.
- 20 10. Composición de acuerdo con las reivindicaciones previas 7-8 para uso en terapia celular adoptiva autóloga o heteróloga, tratamiento de tumor o cáncer, inmunoterapia de tumor o cáncer, y/o tratamiento de leucemia.
11. Composición de acuerdo con las reivindicaciones previas 7-8 para uso en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, linfoma de burkitt, linfoma folicular, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de vejiga, carcinoma de células renales, o melanoma de piel.
- 25 12. Composición de acuerdo con las reivindicaciones previas 7-8 para uso en tratamiento de una infección viral.
13. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación previa 12 en la que el virus es de la familia Herpesviridae o Retroviridae.
- 30 14. Un método para producir una estirpe celular descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende aislar los PBL $\gamma\delta$ y cultivar estas células en medio de cultivo adecuado, con adición regular de agonistas de $\gamma\delta$ TCR y por lo menos una citoquina de la familia $\gamma\delta$ se lleva a cabo hasta que por lo menos 40% de las células expresen receptores de citotoxicidad natural.
15. Método de acuerdo con la reivindicación previa 14 en el que la adición regular de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas $\gamma\delta$ se lleva a cabo hasta que por lo menos 40% de las células expresan NKp30.
- 35 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-15 en el que el agonista de $\gamma\delta$ TCR es fitohemaglutinina-PHA, anticuerpo monoclonal anti-CD3, anticuerpo monoclonal anti- $\gamma\delta$ TCR o mezclas de los mismos.
17. Método de acuerdo con la reivindicación previa 16 en el que el rango de concentración de agonista de $\gamma\delta$ TCR es 0,01-100 μ g/ml.
- 40 18. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14-17 en el que la citoquina $\gamma\delta$ es IL-2, IL-4, IL-9, IL-12, IL-15, IL- 21 o mezclas de las mismas.
19. Método de acuerdo con la reivindicación previa 18 en el que el rango de concentración de citoquina $\gamma\delta$ es 1-10000 U/ml.

20. Método de acuerdo con la reivindicación previa 19 en el que el rango de concentración de citoquina γ c es 100-1000 U/ml.

21. Método de acuerdo con las reivindicaciones 14-20 en el que el rango de tiempo de la adición de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas γ c es 2-60 días.

5 22. Método de acuerdo con la reivindicación previa 21 en el que el rango de tiempo de la adición de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas γ c es 9-25 días.

23. Método de acuerdo con la reivindicación previa 22 en el que el rango de tiempo de la adición de dichos agonistas de $\gamma\delta$ TCR y citoquinas γ c es 10-15 días.

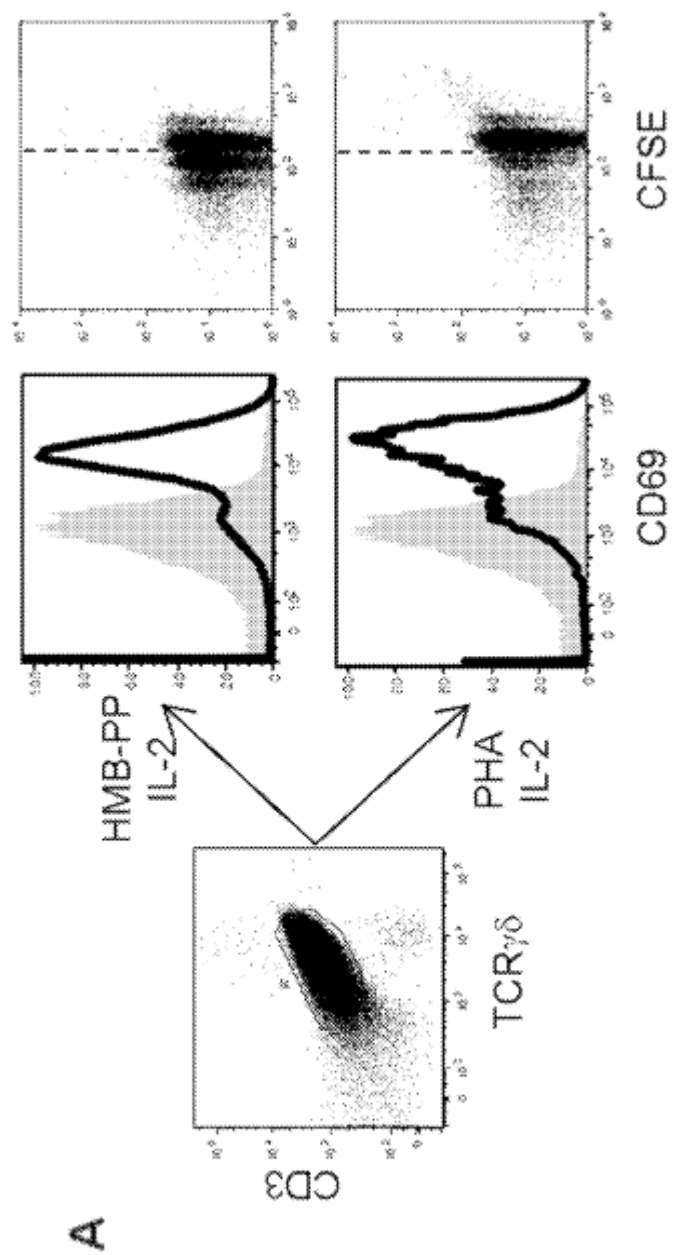


Figura 1a

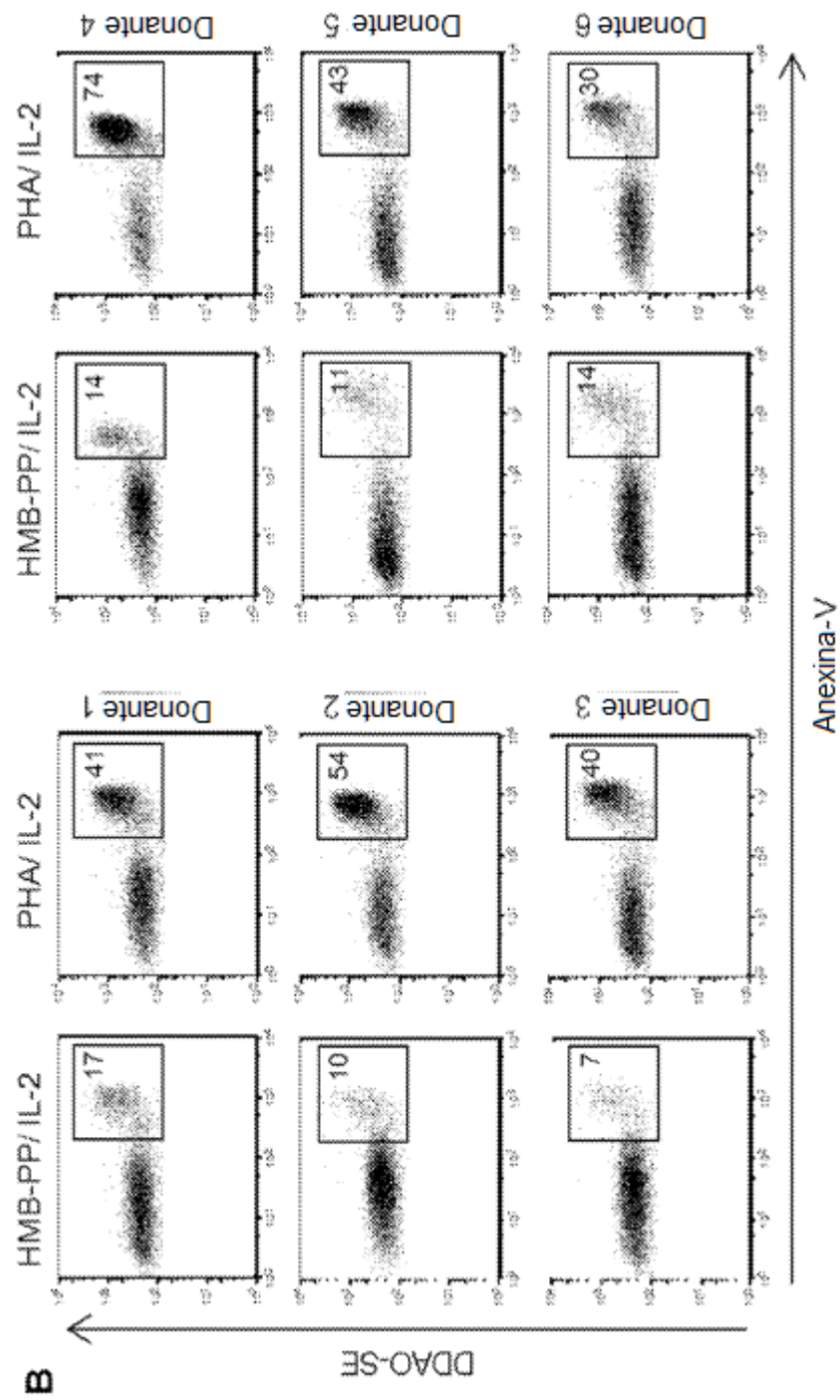


Figura 1b

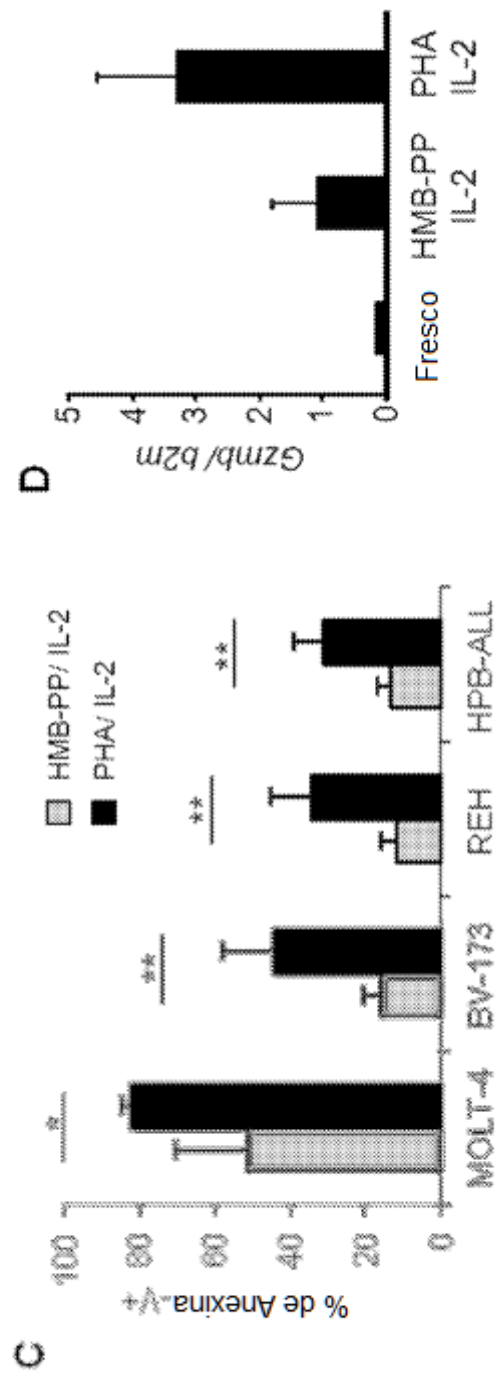


Figura 1c

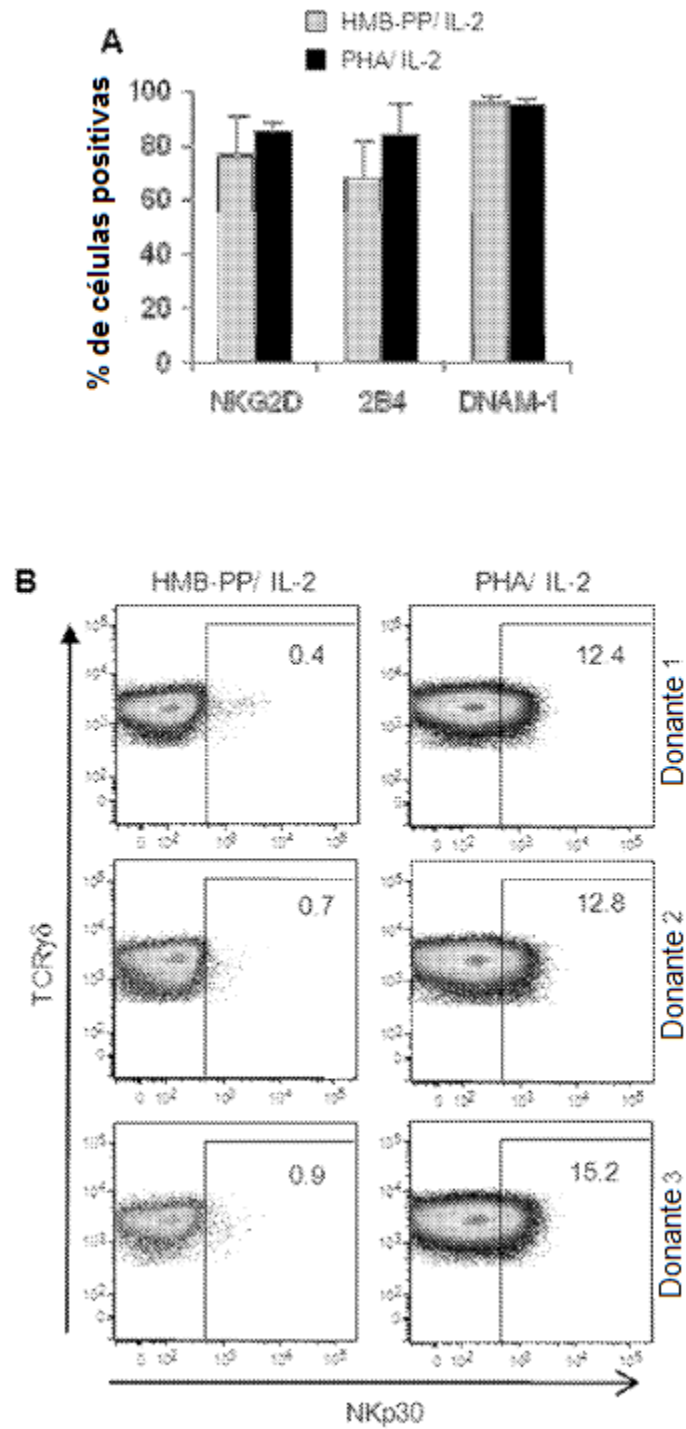


Figura 2a

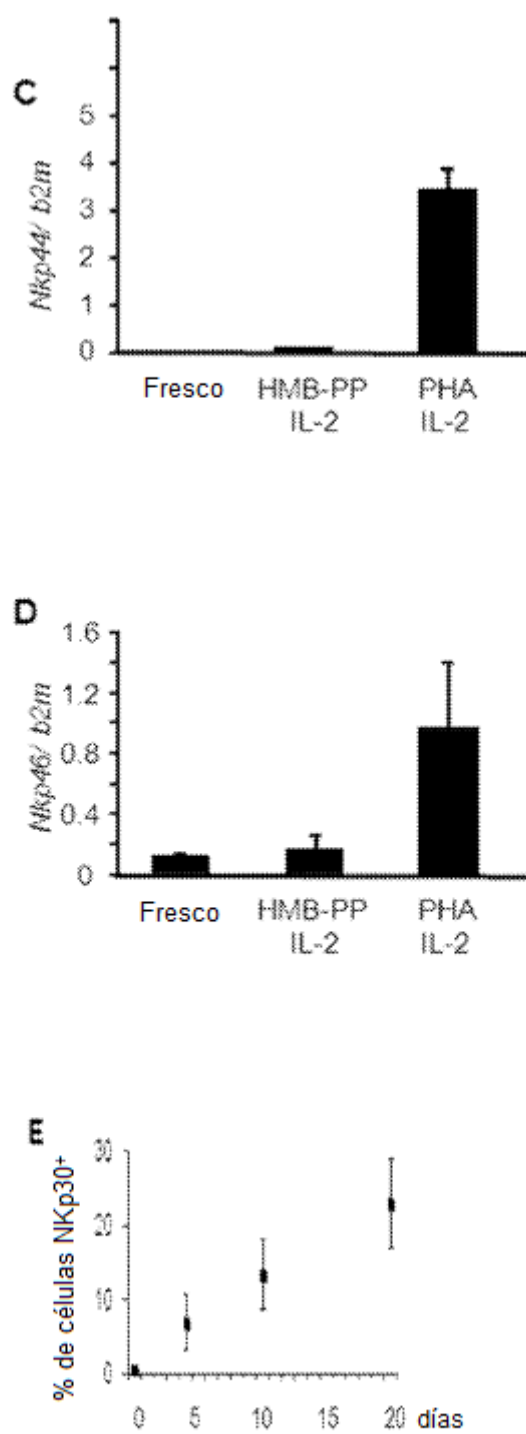


Figura 2b

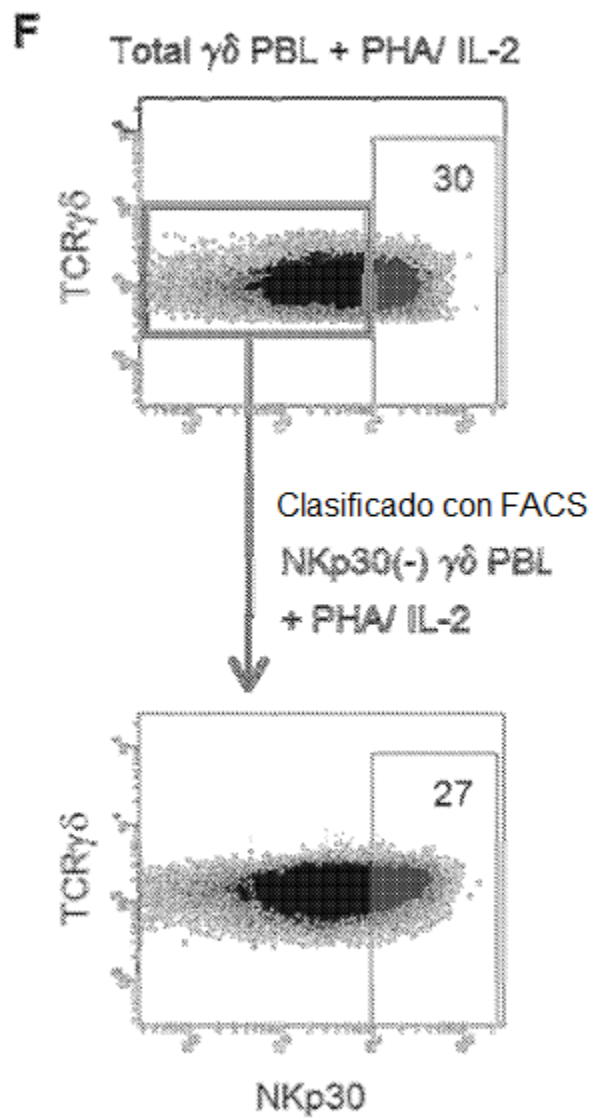


Figura 2c

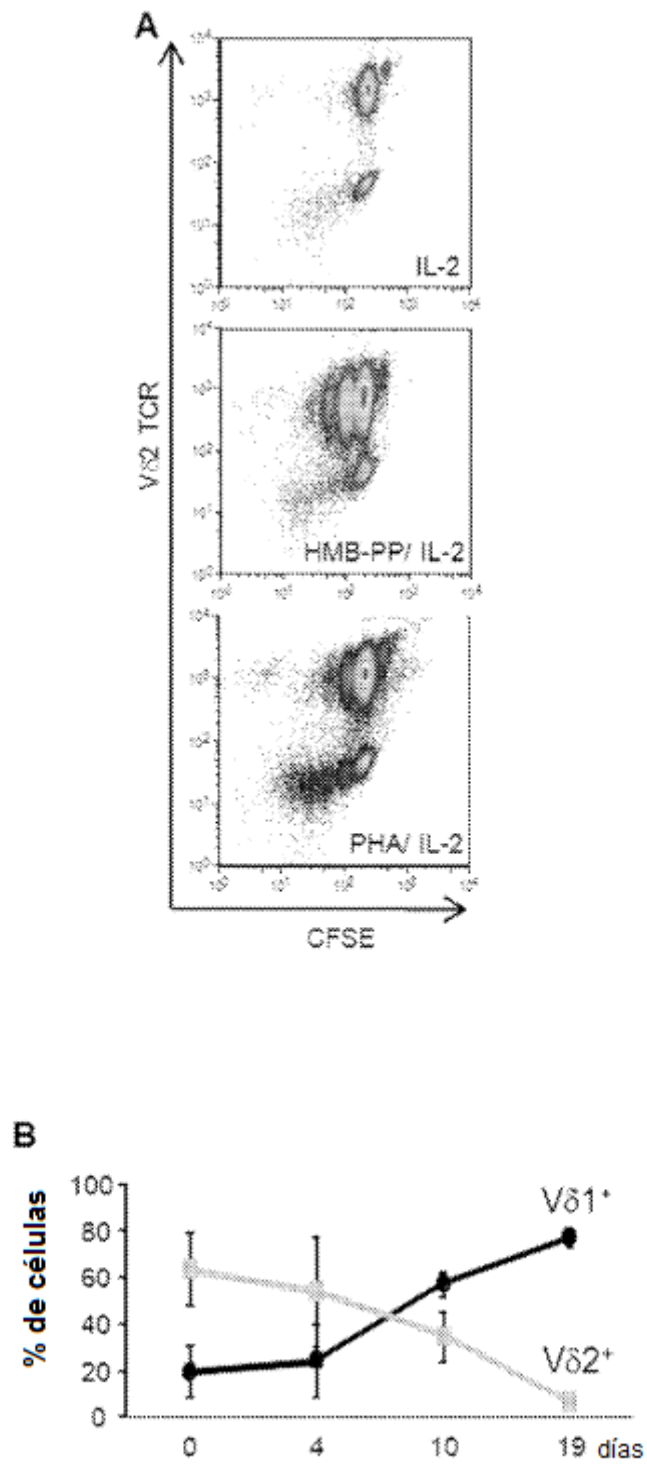


Figura 3a

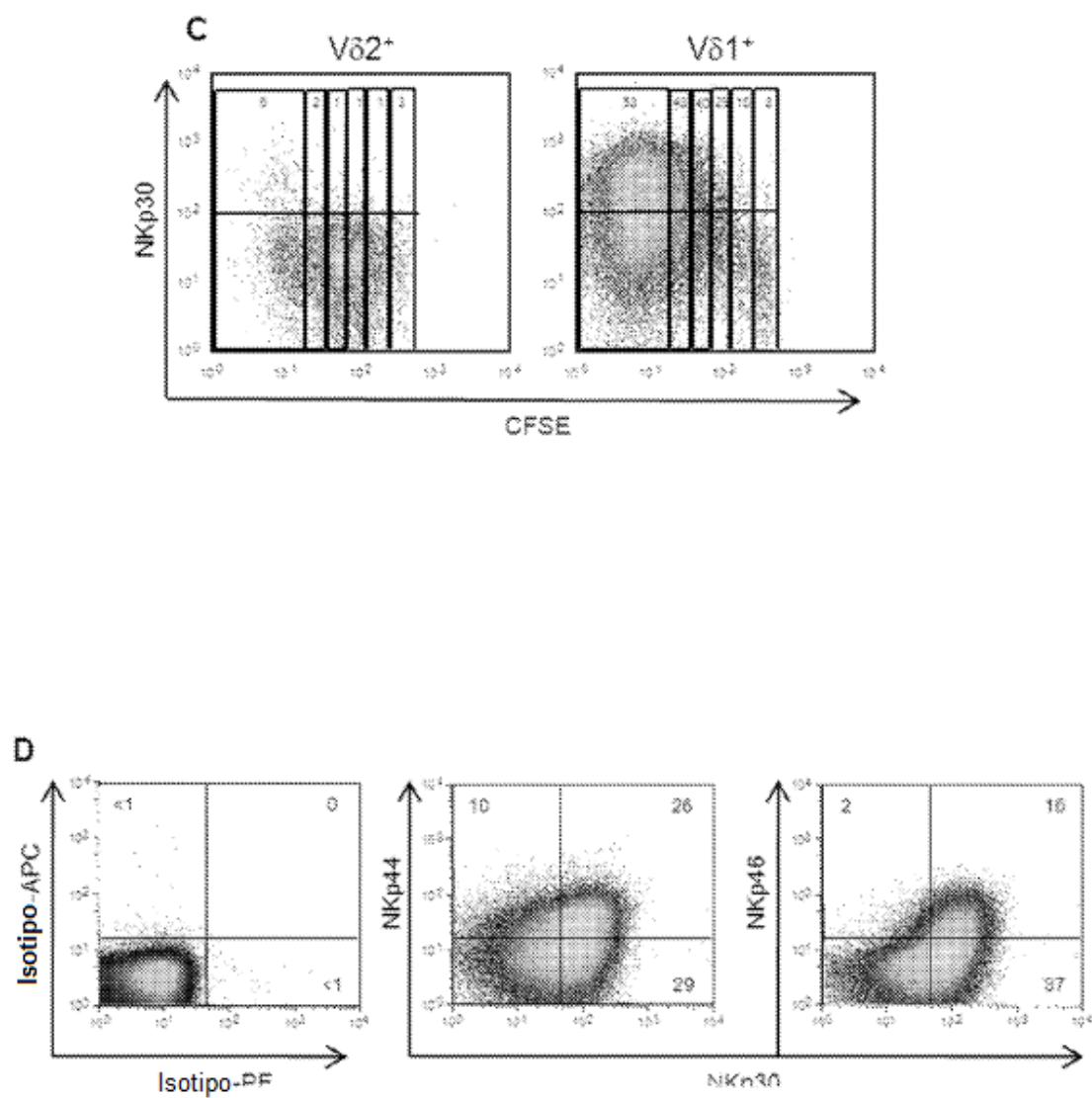


Figura 3b

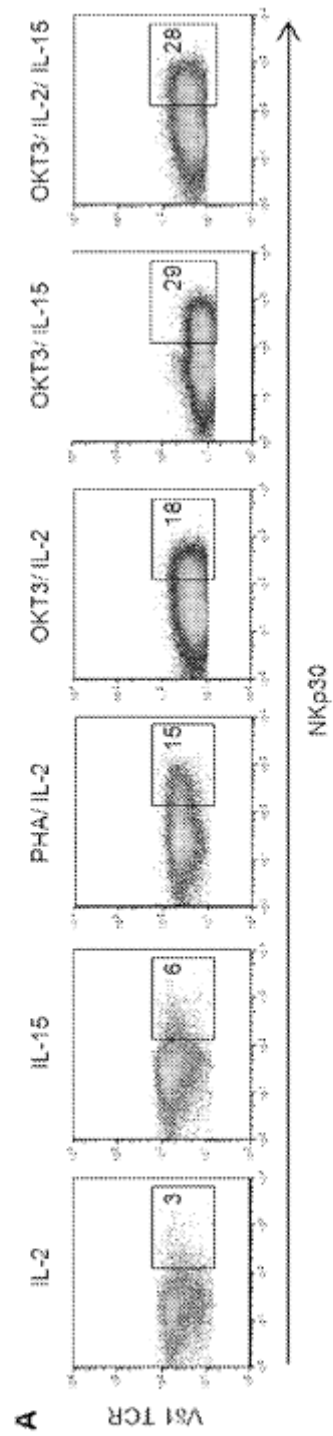


Figura 4a

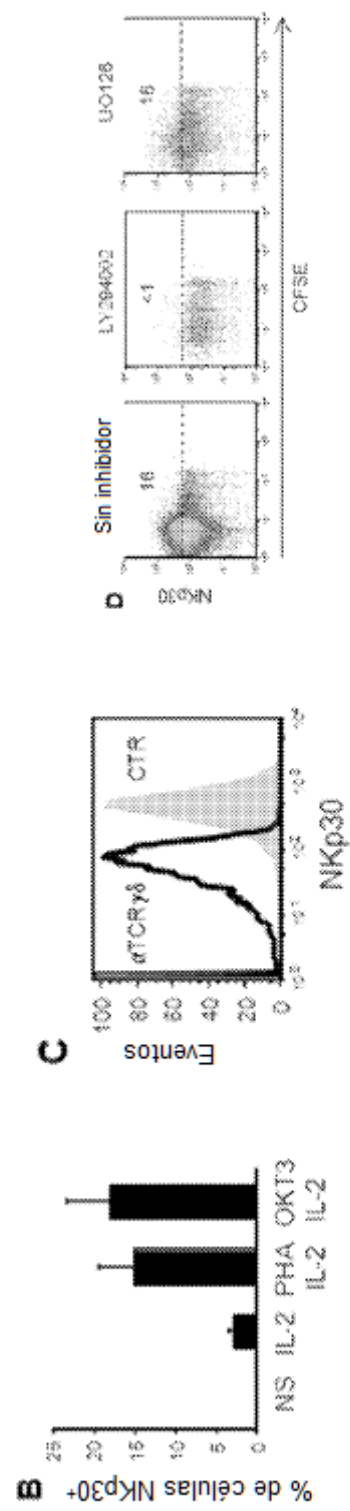


Figura 4b

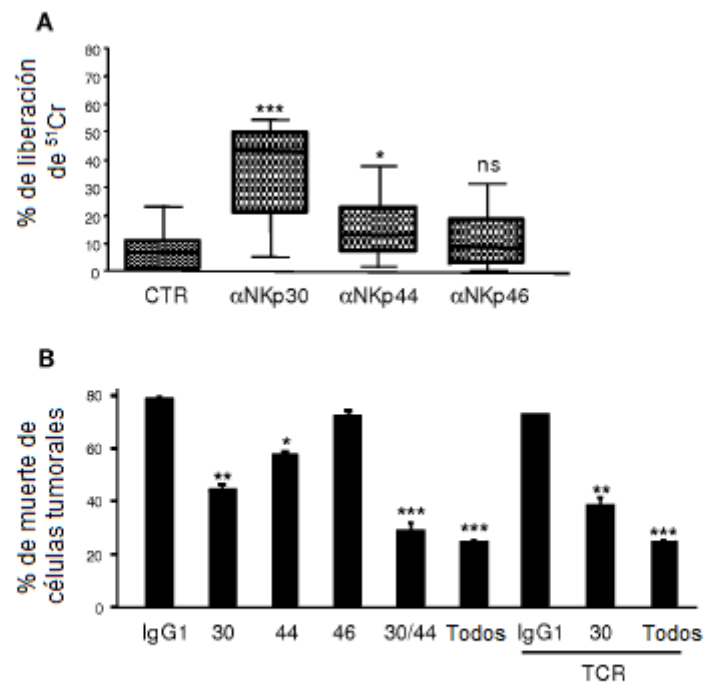


Figura 5

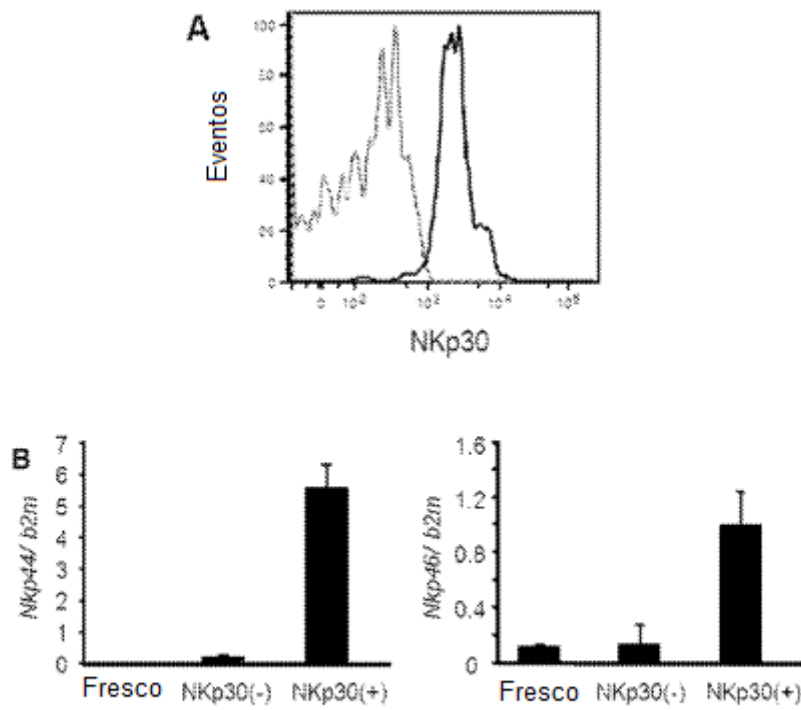


Figura 6a

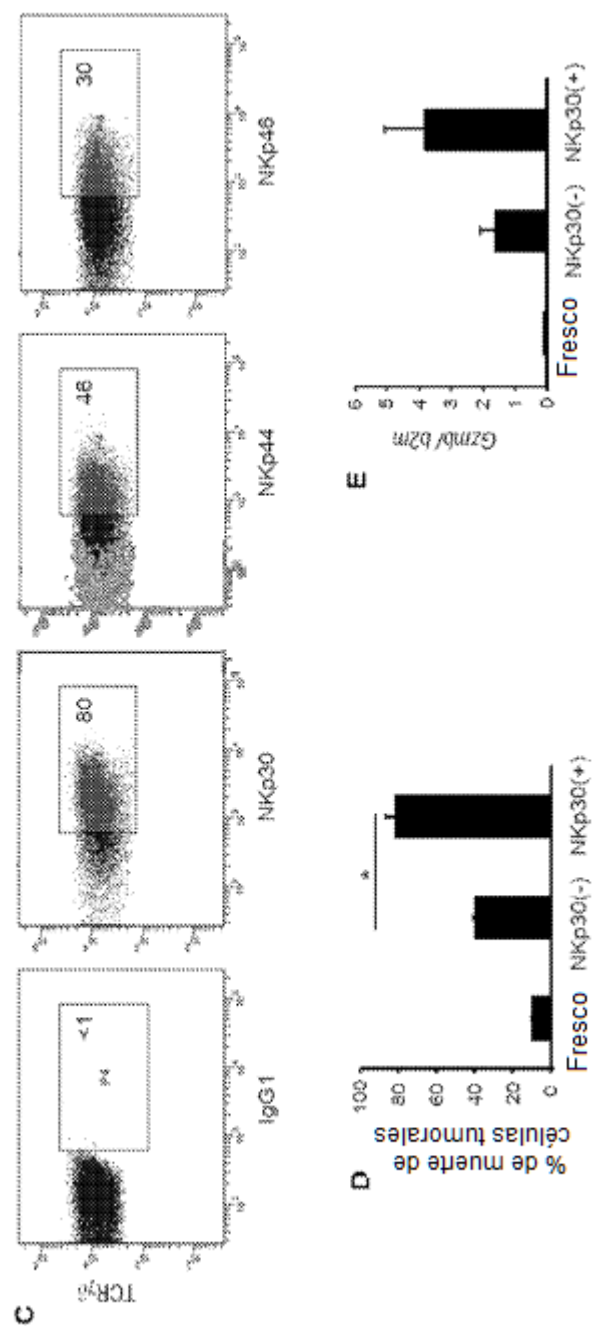


Figura 6b

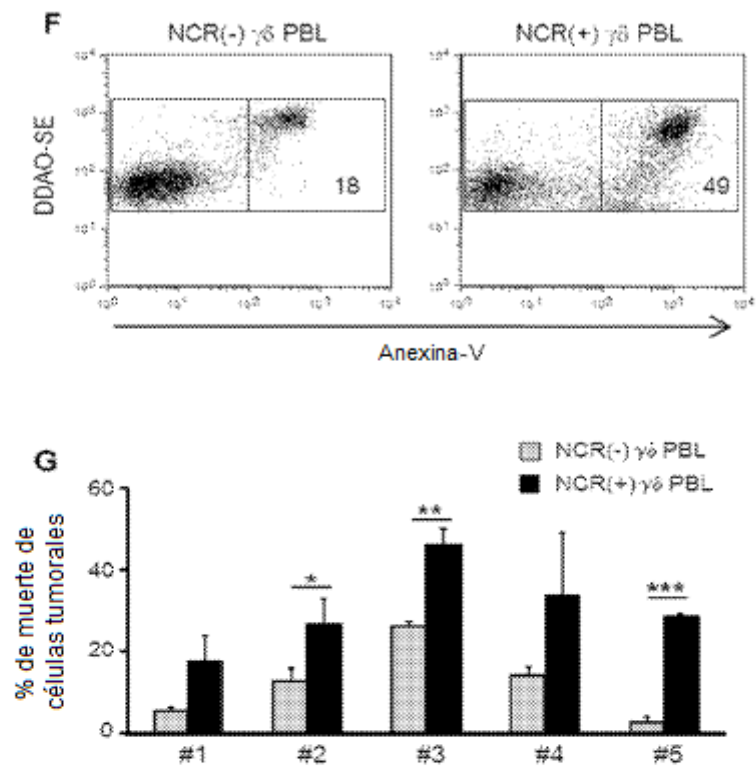


Figura 6

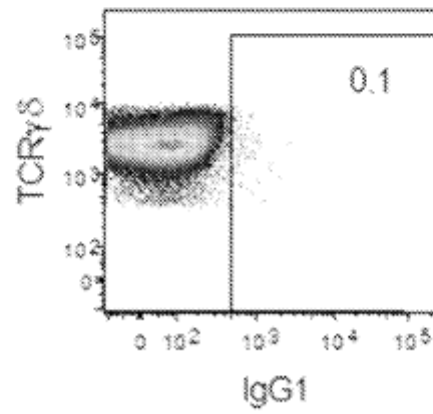


Figura 7

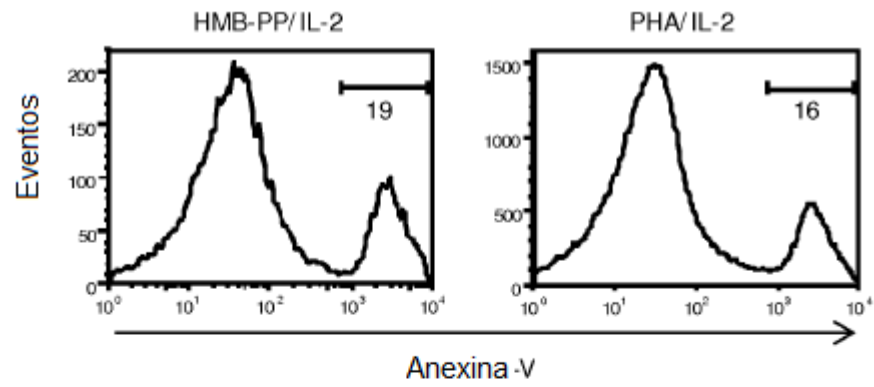


Figura 8

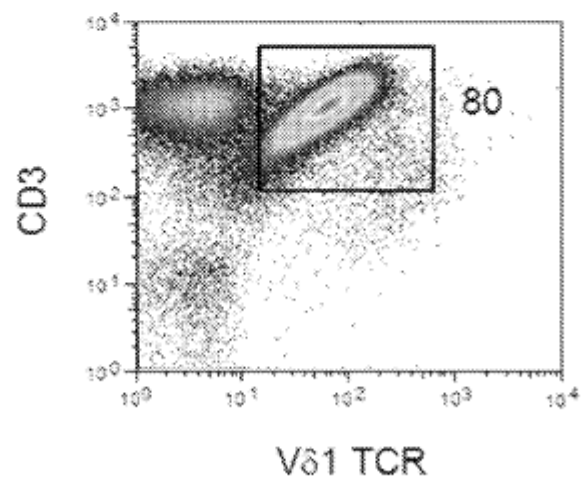


Figura 9

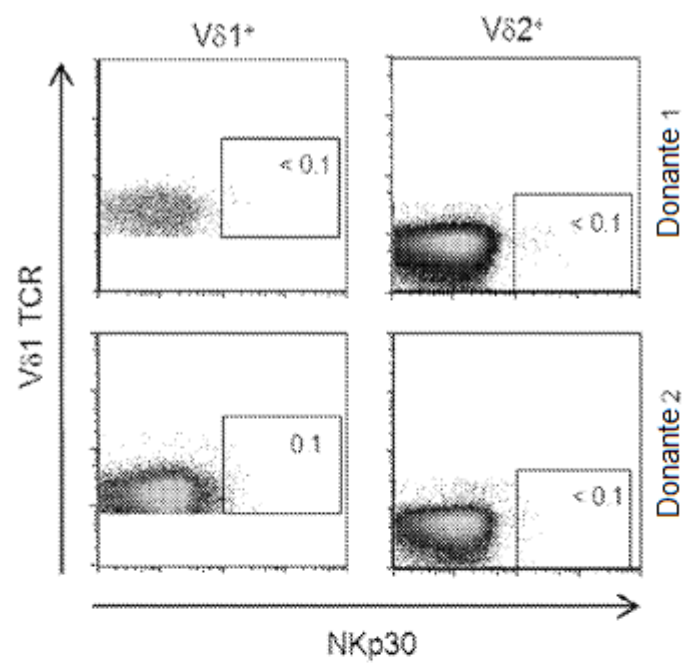


Figura 10

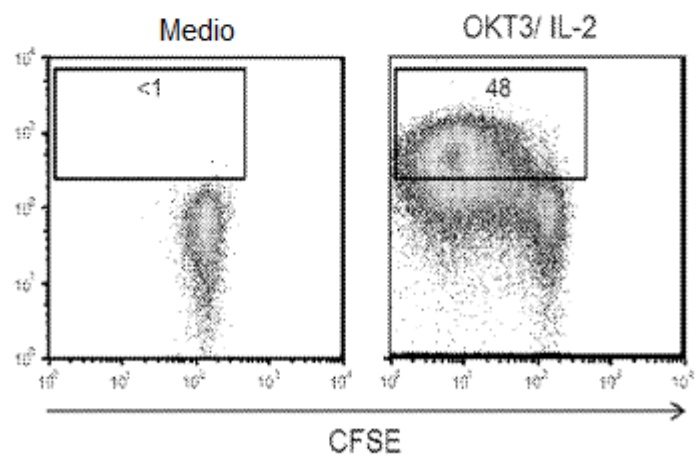


Figura 11

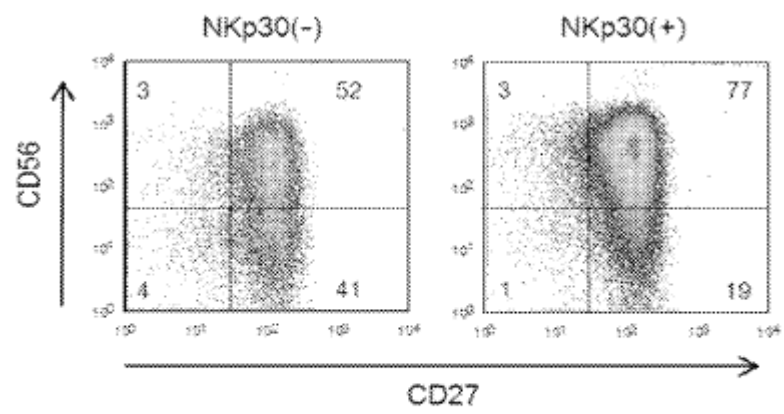


Figura 12

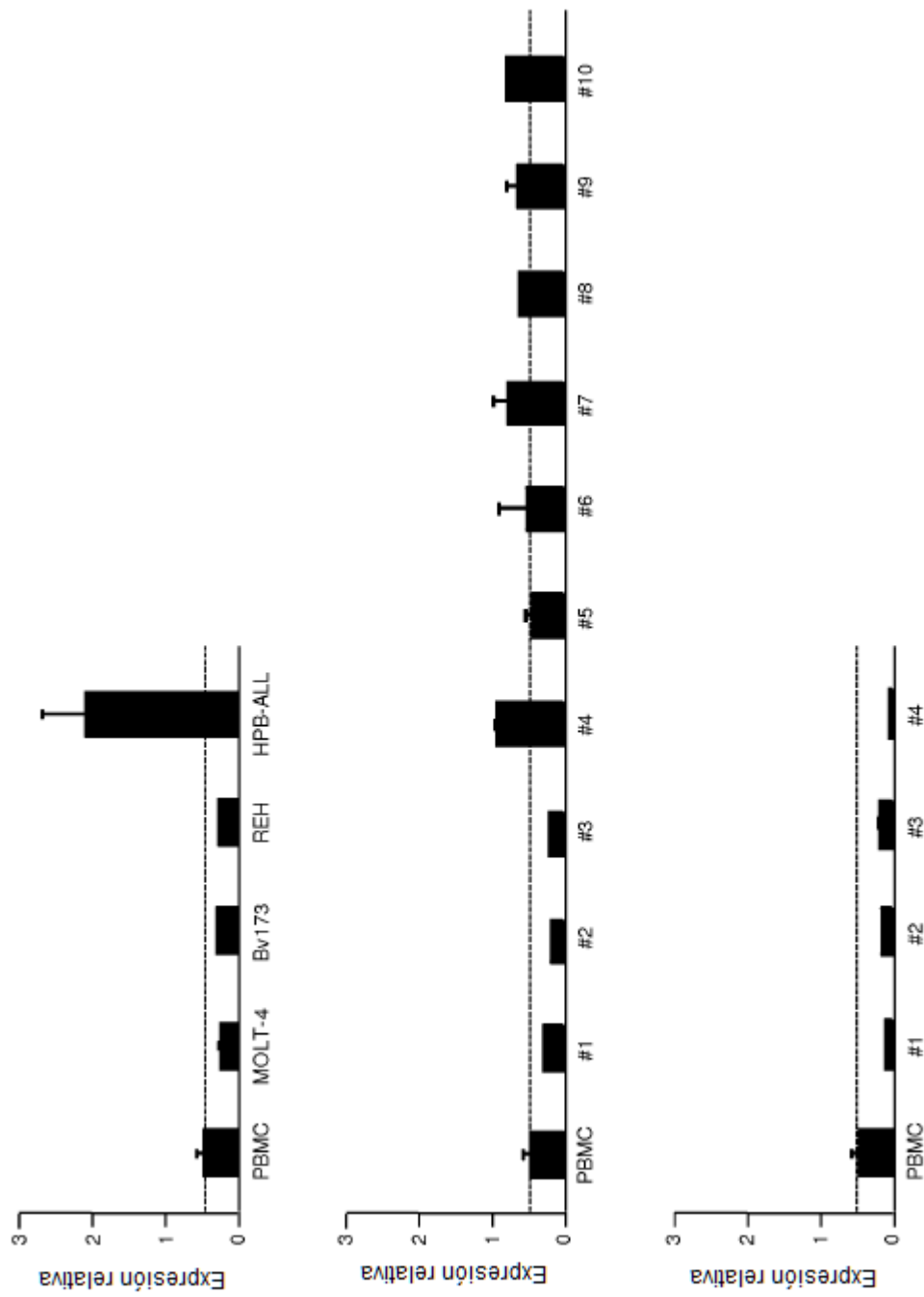


Figura 13

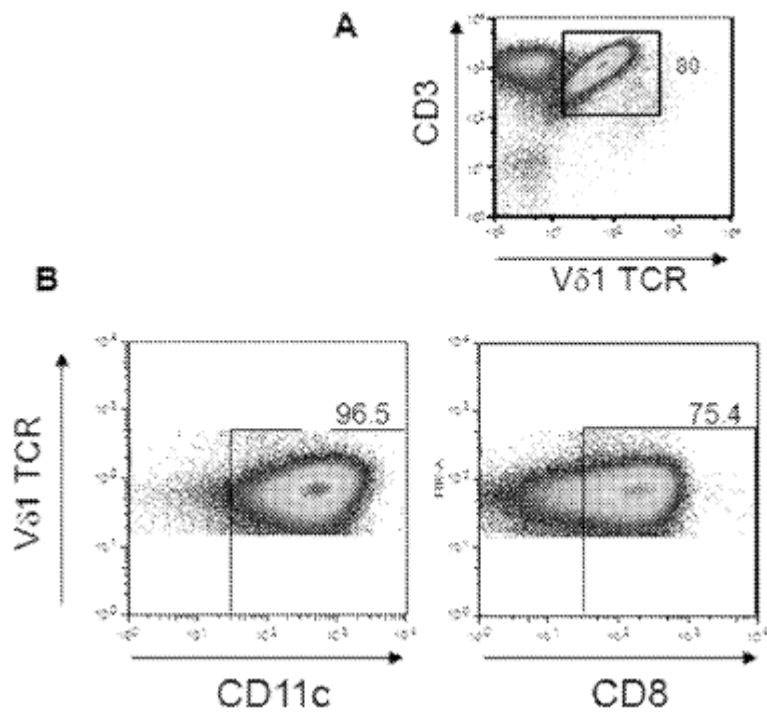


Figura 14

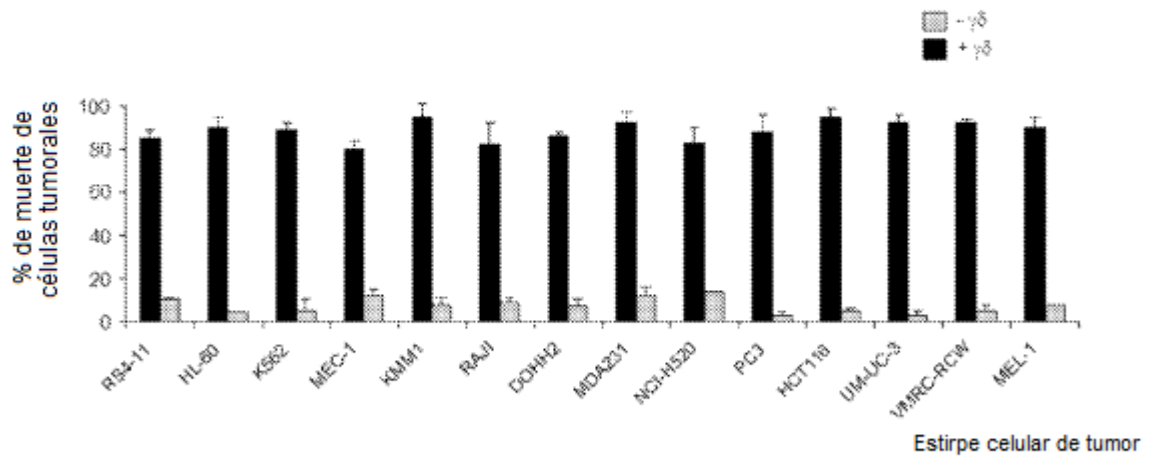


Figura 15